

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II)



TESIS DOCTORAL

**Caracterización del sistema Ghrelinérgico en Ciprínidos:
interacciones con la alimentación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ayelén M. Blanco Imperiali

Directoras

M^a Jesús Delgado Saavedra
Ana Isabel Valenciano González

Madrid, 2018

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GHRELINÉRGICO EN CIPRÍNIDOS

INTERACCIONES CON LA
ALIMENTACIÓN

Ayelén M. Blanco Imperiali

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Directoras: María J. Delgado y Ana I. Valenciano

Madrid 2017



TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA GHRELINÉRGICO EN CIPRÍNIDOS: INTERACCIONES CON LA ALIMENTACIÓN

AYELÉN M. BLANCO IMPERIALI


Directoras: María Jesús Delgado Saavedra y Ana Isabel Valenciano González

2017

Doña **María Jesús Delgado Saavedra**, Catedrática de la Universidad Complutense de Madrid,
y Doña **Ana Isabel Valenciano González**, Profesor Contratado Doctor de la Universidad
Complutense de Madrid, certifican que:

El presente trabajo titulado “Caracterización del sistema ghrelinérgico en Ciprínidos:
Interacciones con la alimentación”, presentado por **Ayelén M. Blanco Imperiali**, licenciada en
Biología, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido
realizado bajo nuestra dirección y reúne todos los requisitos para que pueda ser juzgado por
el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a
15 de marzo de 2017.



Dra. María Jesús Delgado Saavedra



Dra. Ana Isabel Valenciano González

La presente Tesis Doctoral ha sido llevada a cabo en el Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la codirección de la Dra. María Jesús Delgado Saavedra y la Dra. Ana Isabel Valenciano González. Este trabajo se realizó con ayuda del apoyo económico del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (proyectos AGL2013-46448-C3-2R y AGL2016-74857-C3-2R). Ayelén M. Blanco Imperiali ha sido beneficiaria de una beca de Formación de Personal Universitario (AP2012-6451) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.



“El camino no ha sido fácil, pero la experiencia que gané es invaluable.

*Agradezco al gran grupo que me recibió con tanto amor y me dio la oportunidad de
hacer este trabajo posible y a cada uno que compartió una parte del camino
conmigo y me ayudó a crecer y superarme, tanto a nivel personal como profesional.*

Un gracias especial a mis directoras por confiar en mí y por el enorme apoyo.

Me llevo un pedacito de cada uno de ustedes que quedará guardado

siempre en mi corazón.”



Índice

ÍNDICE

RESUMEN / SUMMARY	17
ABREVIATURAS	39
INTRODUCCIÓN	45
1. Regulación de la ingesta	47
1.1. Circuitos centrales que intervienen en la regulación de la ingesta	49
1.2. Señales endocrinas periféricas implicadas en la regulación de la ingesta	54
1. Ghrelina	58
1.1. Estructura	59
1.2. Síntesis, procesamiento, transporte y metabolismo	60
1.3. Ghrelina O-aciltransferasa	63
1.4. Receptores y mecanismo de acción	65
1.5. Funciones	69
1.6. Regulación de su secreción y expresión	74
2. Especies de estudio	77
2.1. Carpín (<i>Carassius auratus</i>)	77
2.2. Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	80
OBJETIVOS	83
RESULTADOS	87
Capítulo 1. Identificación y caracterización de la ghrelina O-aciltransferasa del carpín	89
Resumen	91
▪ Characterization of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in goldfish (<i>Carassius auratus</i>) <i>PLoS ONE</i> 12: e0171874 (2017)	97
▪ Brain mapping of ghrelin O-acyltransferase in goldfish (<i>Carassius auratus</i>): novel roles for the ghrelinergic system in fish? <i>Anat Rec</i> 299: 748-758 (2016)	133
Capítulo 2. La alimentación en la regulación del sistema ghrelinérgico del carpín	145
Resumen	147

▪ Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (<i>Carassius auratus</i>) <i>J Comp Physiol B</i> 186: 727-738 (2016)	153
▪ Tissue-specific expression of ghrelinergic and NUCB2/nesfatin-1 systems in goldfish (<i>Carassius auratus</i>) is modulated by macronutrient composition of diets <i>Comp Biochem Physiol A</i> 195: 1-9 (2016)	165
Capítulo 3. La ghrelina como regulador de la funcionalidad del sistema digestivo del carpín	175
Resumen	177
1. La ghrelina y su acción sobre la expresión de enzimas digestivas	177
2. La ghrelina y su rol en el transporte intestinal de glucosa	181
3. La ghrelina como moduladora de otras hormonas entéricas	186
▪ Ghrelin modulates gene and protein expression of digestive enzymes in the intestine and hepatopancreas of goldfish (<i>Carassius auratus</i>) via the GHS-R1a: possible roles of PLC/PKC and AC/PKA intracellular signaling pathways <i>Mol Cell Endocrinol</i> 442: 165-181 (2017)	191
▪ Ghrelin facilitates GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-mediated intestinal glucose transport in goldfish (<i>Carassius auratus</i>) <i>Sci Rep</i> 7: 45024	209
▪ Ghrelin suppresses cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the intestine, and attenuates the anorectic effects of CCK, PYY and GLP-1 in goldfish (<i>Carassius auratus</i>) <i>Horm Behav (Under review)</i>	229
Capítulo 4. Desarrollo de peces cebra deficientes de <i>preproghrelina</i>: caracterización de la generación F₀	239
Resumen	241
DISCUSIÓN	247
1. La GOAT, un elemento clave en el sistema ghrelinérgico	249
2. La alimentación: factor clave en la regulación del sistema ghrelinérgico del carpín	258
3. El sistema ghrelinérgico y su implicación en funciones digestivas de los teleósteos	265
4. Observaciones finales	274
CONCLUSIONES	277

BIBLIOGRAFÍA	283
ANEXOS METODOLÓGICOS	331
Anexo metodológico I: Modelos animales. Mantenimiento, manipulación y obtención de muestras biológicas	333
I.1. Mantenimiento de las especies de estudio	334
I.1.1. Carpín	334
I.1.2. Pez cebra	335
I.2. Reproducción del pez cebra	336
I.3. Técnicas de anestesia	338
I.4. Administración intraperitoneal (IP) de fármacos y hormonas	339
I.5. Obtención de muestras biológicas	339
I.5.1. Extracción de sangre	339
I.5.2. Extracción de tejidos	340
Anexo metodológico II: Técnicas de biología molecular para ácidos nucleicos y proteínas .	343
II.1. Extracción de ácidos nucleicos	343
II.1.1. Extracción de ARN	343
II.1.2. Extracción de ADN	345
II.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm): Transcripción inversa o retrotranscripción (RT)	346
II.3. Amplificación de ADN o ADNc: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .	347
II.4. Cuantificación génica: PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)	349
II.5. Obtención de una secuencia génica completa: Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) - PCR	351
II.5.1. Amplificación del extremo 3'	351
II.5.2. Amplificación del extremo 5'	352
II.6. Separación y visualización de ácidos nucleicos: Electroforesis	352
II.6.1. Electroforesis en gel de agarosa/MOPS para visualización de ARN	353
II.6.2. Electroforesis en gel de agarosa/TAE para visualización de ADN	355
II.6.3. Electroforesis en gel de acrilamida/TBE para visualización de ADN ..	356
II.7. Clonación molecular	357
II.7.1. Obtención y purificación del ADN a clonar	358
II.7.2. Ligación del ADN (inserto) en un vector plasmídico de expresión	358

II.7.3. Transformación de bacterias competentes y cultivo en medio sólido y líquido	359
II.7.4. Extracción de ADN plasmídico de cultivo bacteriano: <i>miniprep</i> y <i>maxiprep</i>	360
II.7.5. Comprobación de la clonación: Tratamiento del ADN plasmídico con enzimas de restricción	361
II.8. Extracción de proteínas	362
II.8.1. Extracción de proteínas a partir de células en cultivo	363
II.8.2. Extracción de proteínas a partir de tejidos	364
II.9. Cuantificación de proteínas	364
II.9.1. Método del BCA	364
II.9.2. Método de Bradford	365
II.10. Detección de proteínas: Electrotransferencia, inmunoblot o <i>Western blot</i>	366
II.11. Bioinformática	371
II.11.1. Alineamiento de secuencias: Clustal Omega y BLAST	371
II.11.2. Construcción de árboles filogenéticos: MEGA6	372
II.11.3. Análisis de propiedades físico-químicas de proteínas: ProtParam	372
II.11.4. Predicción de la existencia de péptido señal dentro de una secuencia proteica: SignalP 4.1	372
II.11.5. Predicción de la topología de las proteínas de membrana: MemBrain	373
Anexo metodológico III: Cultivos celulares	377
III.1. Cultivo de explantes primarios	378
III.2. Cultivo celular	381
III.2.1. Cultivo celular primario	382
III.2.1.1. Aislamiento de células intestinales del carpín	382
III.2.1.2. Estudio inmunocitoquímico de procesos de translocación	383
III.2.1. Cultivo de línea celular continua o estable	385
III.2.2.1. Mantenimiento y manipulación de líneas celulares estables	386
III.2.2.2. Transfección celular	387
Anexo metodológico IV: Inmunofluorescencia	391
IV.1. Inclusión de muestras en parafina	392
IV.2. Corte de las muestras en micrótomos	394
IV.3. Inmunotinción	395

IV.4. Visualización de fluorescencia y tratamiento de imágenes	398
Anexo metodológico V: Enzimoinmunoensayo	401
V.1. ELISA sándwich	402
Anexo metodológico VI: Técnicas de manipulación genética: CRISPR-Cas9	405
VI.1. Dirección de la edición genómica: Selección del sitio diana de mutación y diseño del molde de reparación	408
VI.1.1. Diseño del ARN guía	408
VI.1.2. Diseño del molde de reparación	409
VI.2. Generación del ARN guía	409
VI.3. Generación de la Cas9	411
VI.4. Introducción del ARN guía, Cas9 y molde de reparación en peces cebra mediante microinyección directa de huevos fecundados	412
VI.5. Transferencia genética vertical: Cruces selectivos	413
VI.6. Análisis de mutagénesis inducida por CRISPR-Cas9: Genotipado	415
VI.6.1. Genotipado de individuos de la F0	415



Resumen / Summary

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La ingesta está sometida a un control complejo en el que intervienen numerosos reguladores neurales, endocrinos y neuroendocrinos. Entre ellos, la ghrelina, sintetizada principalmente por el estómago, o su equivalente en especies que carecen de él, destaca por tratarse de la única hormona periférica de carácter orexigénico descrita hasta el momento actual. La forma activa de esta hormona requiere la unión de un ácido graso de cadena media a la posición 3 de la cadena peptídica que es catalizada por la enzima ghrelina O-aciltransferasa (GOAT), localizada en la membrana del retículo endoplásmico. La acilación de la ghrelina es esencial para la unión a su principal receptor, el receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R), lo que confiere a la GOAT un papel fundamental para el funcionamiento del sistema ghrelinérgico. En la actualidad, numerosos aspectos estructurales y funcionales de esta enzima permanecen desconocidos, especialmente en peces.

La síntesis y secreción de ghrelina, así como el funcionamiento del sistema ghrelinérgico en general, están reguladas por diversos factores de naturaleza exógena, como la alimentación, y endógena, incluyendo un control hormonal y un control neural. La alimentación es el principal regulador del sistema ghrelinérgico en los mamíferos, en los que la ghrelina se considera una señal iniciadora de la alimentación, ya que sus niveles circulantes se elevan preprandialmente y disminuyen después de una comida. Además, la expresión y secreción de esta hormona se ven incrementadas tras periodos de privación de alimento de distinta duración, y son reguladas por otros aspectos relacionados con la ingesta, como el patrón de alimentación y la composición de la dieta. En los peces, apenas se ha investigado la posible regulación ejercida por la alimentación sobre la síntesis y liberación de

ghrelina, y los escasos estudios disponibles muestran en ocasiones observaciones opuestas, como ocurre con los efectos del ayuno. Asimismo, muy poco se conoce en estos vertebrados acerca del posible papel de la alimentación sobre otros componentes clave del sistema ghrelinérgico, como son la GOAT y los GHS-R, regulación que podría ser de gran importancia para el funcionamiento del sistema.

La ghrelina es una hormona pleiotrópica que se ha implicado en numerosas funciones, de las cuales su acción estimuladora sobre la liberación hipofisaria de hormona de crecimiento y sus efectos sobre la regulación de la ingesta y el balance energético son las más estudiadas. En cuanto a la regulación de la ingesta, la ghrelina es capaz de estimular significativamente el apetito en la mayoría de los vertebrados estudiados hasta el momento, exceptuando las aves y algunas especies de peces. La estimulación del apetito por la ghrelina implica fundamentalmente la activación de circuitos centrales orexigénicos, tanto en mamíferos como en peces. No obstante, se desconoce si la acción orexigénica de la ghrelina se debe también a la activación/inactivación de sistemas periféricos reguladores del apetito. La ghrelina también interviene en el control de la ingesta de manera indirecta, regulando la motilidad intestinal y las secreciones digestivas, incluyendo la secreción ácida gástrica y de enzimas pancreáticas, acciones que se han descrito en los mamíferos pero permanecen desconocidas en los peces.

Respecto al balance energético, la ghrelina ha sido implicada fundamentalmente en el metabolismo de la glucosa en los mamíferos. En los peces, algún estudio ha relacionado a esta hormona con el metabolismo glucídico, habiéndose descrito que la ghrelina conduce a una situación de hiperglucemia a través de una acción inhibidora de la secreción de insulina y estimuladora de la secreción de glucagón (principales hormonas encargadas de mantener la homeostasis glucosídica). Además, se ha relacionado a esta hormona con los mecanismos sensores de glucosa, pues activa marcadores glucosensores en el hipotálamo y el cerebro posterior de la trucha arco iris. Todos estos resultados demuestran la implicación de la ghrelina en el metabolismo de la glucosa en peces, pero muchos aspectos de esta funcionalidad permanecen aún desconocidos.

OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es profundizar en los conocimientos acerca del funcionamiento del sistema ghrelinérgico en teleósteos, utilizando como modelos animales el carpín y el pez cebra. Para abordar este objetivo general, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de la GOAT del carpín: debido a la importancia de la acilación de la ghrelina para la unión a su principal receptor, nos proponemos identificar la secuencia génica, estructura y topología de la GOAT. Posteriormente, analizaremos su patrón tisular de expresión, su posible regulación por ghrelina y su perfil diario de expresión.
- Estudio de los efectos de la alimentación sobre el sistema ghrelinérgico del carpín: a fin de investigar el papel de la alimentación en la regulación del sistema ghrelinérgico, determinaremos los cambios periprandiales del sistema, el efecto de ayunos de distinta duración y la posible influencia de la composición de la dieta.
- Caracterización de los efectos de la ghrelina sobre la regulación del apetito y la fisiología digestiva del carpín: se estudiará la posible intervención de reguladores enteroendocrinos anorexigénicos en la acción orexigénica de la ghrelina. Asimismo, se analizarán posibles efectos de esta hormona, no estudiados hasta la fecha en peces, en la regulación de la expresión de enzimas digestivas y de los mecanismos de absorción intestinal de glucosa.
- Desarrollo de una línea transgénica de pez cebra carente de *preproghrelina*: se utilizará un abordaje genético para profundizar en el estudio de la funcionalidad del sistema ghrelinérgico en teleósteos. Para ello, se iniciará el desarrollo de peces cebra carentes de *preproghrelina*, y en la generación F₀, se estudiará el efecto del silenciamiento génico de esta hormona sobre la expresión de reguladores del apetito centrales y periféricos, enzimas digestivas y transportadores de glucosa.

RESULTADOS

Los resultados de la presente Tesis Doctoral se han estructurado en cuatro capítulos que se resumen a continuación:

Capítulo 1: Identificación y caracterización de la GOAT del carpín

El primer objetivo de este capítulo se ha centrado en la identificación de la secuencia génica del gen *goat* del carpín mediante técnicas de PCR y amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del ADNc (RACE). Los resultados revelaron la existencia de dos transcritos de ARNm (de 1491 y 1413 pb) a los que denominamos *goat-V1* y *goat-V2*. Hemos encontrado que el gen de *goat* del carpín contiene cuatro exones y tres intrones y que muestra un patrón de transcripción particular, pues de los dos primeros exones (exón 1' y exón 1) se transcribe el exón 1', a diferencia de la mayoría de los vertebrados que transcriben el exón 1. Las dos variantes de *goat* identificadas codificarían para proteínas de 393 y 367 aminoácidos,

respectivamente, con alta homología respecto a la GOAT del resto de vertebrados. Empleando herramientas bioinformáticas, observamos que tanto GOAT-V1 como GOAT-V2 son proteínas integrales de membrana, con 11 y 9 dominios transmembrana, respectivamente, y que presentan los dos residuos aminoacídicos claves para la funcionalidad de la enzima (asparagina-307 e histidina-338) en similar posición topológica respecto a la GOAT de los mamíferos y otras O-aciltransferasas unidas a membranas.

A continuación, se estudió el patrón tisular de expresión de las dos variantes de *goat* en tejidos centrales y periféricos mediante la técnica de RT-qPCR. Ambas variantes presentan un patrón de expresión tisular muy similar, con los mayores niveles en las gónadas y el tracto gastrointestinal. La expresión proteica de GOAT en regiones intestinales se confirmó mediante técnicas inmunohistoquímicas, encontrando que una subpoblación de células de la mucosa intestinal coexpresan GOAT y ghrelina, lo que indica que el proceso de acilación de la ghrelina puede tener lugar de forma local en el intestino del carpín. Del mismo modo, se estudió la distribución anatómica de la GOAT en el cerebro, observándose que los mayores niveles de esta enzima se encuentran en el cerebro posterior, incluyendo el lóbulo vagal y algunos tractos de fibras. Otras áreas encefálicas que muestran expresión de GOAT, aunque en menores niveles, son el telencéfalo, algunos núcleos hipotalámicos, la glándula pineal, el techo óptico y el cerebelo.

Como aproximación a los mecanismos de regulación que subyacen a la expresión de GOAT, hemos estudiado si la expresión intestinal de GOAT se encuentra regulada por su sustrato, ghrelina. Empleando un sistema de cultivo de explantes primarios de intestino anterior de carpín expuestos a distintas concentraciones de ghrelina acilada, observamos que ésta ejerce una inhibición tiempo-dependiente de la expresión y cantidad de la enzima. Estas observaciones sugieren la existencia de un mecanismo de inhibición de GOAT por producto final, similar al descrito en otras aciltransferasas.

En último lugar, hemos estudiado la posible ritmicidad en la expresión de *goat* y la influencia del horario de alimentación sobre la misma. En los peces alimentados durante la fase diurna del fotociclo diario, la expresión de *goat* exhibe una oscilación rítmica en el hipotálamo, la hipófisis y el bulbo intestinal, con los niveles máximos (acrofase) observados durante la fase nocturna en los tres tejidos. Estos patrones rítmicos no fueron detectados cuando los peces se alimentaron durante la fase nocturna, lo que demuestra que los ritmos diarios de expresión de *goat* están fuertemente relacionados con el horario de alimentación. Esta respuesta rítmica de *goat* induce a pensar en una posible funcionalidad del sistema ghrelinérgico como señal de salida del sistema circadiano en los peces.

Capítulo 2: La alimentación en la regulación del sistema ghrelinérgico del carpín

El primer objetivo fue estudiar los posibles cambios periprandiales de los diferentes componentes del sistema ghrelinérgico. Los resultados obtenidos muestran un marcado aumento preprandial de los niveles circulantes de ghrelina acilada (pero no desacilada) y de GOAT, lo que sugiere que esta forma acilada podría estar actuando como señal iniciadora de la alimentación en el carpín. Esta conclusión está respaldada por el incremento preprandial observado en la expresión de *preproghrelina* en el bulbo intestinal. Asimismo, el hecho de que los transcritos de *ghs-rla1* resulten también incrementados preprandialmente sugiere que dicho subtipo de receptor estaría implicado en esta acción propuesta. Las variaciones postprandiales observadas en la expresión de la mayor parte de los componentes del sistema ghrelinérgico en el telencéfalo y el lóbulo vagal refuerzan la relevancia de la alimentación en el control de dicho sistema.

En segundo lugar, analizamos las modificaciones inducidas por periodos de ayuno de corta (7 días) y larga (30 días) duración sobre el sistema ghrelinérgico. Los resultados obtenidos revelan que los periodos de ayuno analizados no modifican los niveles circulantes de ghrelina acilada, desacilada y GOAT, a diferencia de las observaciones generales publicadas en mamíferos. No obstante, encontramos importantes incrementos en la expresión de *preproghrelina* y *goat* en el telencéfalo y el bulbo intestinal inducidos por la privación de alimento. El análisis de la respuesta de los receptores de ghrelina a la exposición al ayuno demostró una implicación diferencial de los distintos subtipos de receptores, siendo el subtipo GHS-R1a el que resultó más afectado en el telencéfalo y el bulbo intestinal. El lóbulo vagal también parece tener importancia en las respuestas del sistema ghrelinérgico frente a la falta de alimentación, siendo en este tejido los receptores de tipo 2 los que se sobreexpresan por la exposición al ayuno.

Por último, hemos estudiado si los cambios en la composición de la dieta pueden alterar el sistema ghrelinérgico del carpín, para lo cual se alimentaron los peces con dietas enriquecidas en carbohidratos, proteínas o lípidos. Los resultados de este trabajo demuestran una regulación diferencial de la expresión de varios componentes del sistema ghrelinérgico inducida por los distintos macronutrientes, que parece ser dependiente del órgano en estudio. Así, las dietas ricas tanto en carbohidratos como en lípidos producen incrementos significativos en la expresión de *preproghrelina*, *goat* y *ghs-rla* en la hipófisis, mientras que ninguna de las ellas induce variaciones de expresión génica en el hipotálamo. En el sistema digestivo, la alimentación a largo plazo con una dieta rica en carbohidratos induce un aumento de la expresión de *goat* y *ghs-rl* en el intestino anterior, pero no en el hígado. Por el

contrario, una dieta rica en proteínas no modifica el sistema ghrelinérgico en el intestino anterior, pero conlleva una disminución de la expresión de *preproghrelina* y *ghs-r1* en el hígado al cabo de una semana.

Capítulo 3: La ghrelina como regulador de la funcionalidad del sistema digestivo del carpín

Este capítulo se ha dirigido a investigar posibles nuevas funciones de la ghrelina en relación a la digestión y absorción de nutrientes, así como al estudio de los mecanismos subyacentes a las acciones orexigénicas de esta hormona en el carpín.

El primer objetivo fue estudiar si la ghrelina interviene en la modulación de enzimas digestivas, eligiendo concretamente una carbohidrasa (la sacarasa-isomaltasa), dos proteasas (la aminopeptidasa A y la tripsina) y la lipoproteína lipasa. En una primera aproximación se realizó un estudio inmunohistoquímico que reveló la presencia de células coexpresando ghrelina y cada una de las enzimas digestivas elegidas, así como de células que colocan GHS-R1a y enzimas digestivas, tanto en el intestino como en el hígado del carpín. Esta observación sugiere una posible interacción entre el sistema ghrelinérgico y las enzimas digestivas en estudio, hipótesis que hemos investigado llevando a cabo cultivos de explantes primarios de intestino e hígado expuestos a diferentes concentraciones de ghrelina acilada. Los resultados demuestran que la ghrelina estimula la expresión de la mayoría de las enzimas digestivas estudiadas en el intestino y el hígado del carpín *in vitro*, siendo este efecto dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Entre las diferentes enzimas estudiadas, los efectos más notables de la ghrelina se han observado en la sacarasa-isomaltasa, lo que podría indicar una implicación particular de la ghrelina en la digestión de hidratos de carbono. Haciendo uso de un antagonista del receptor GHS-R1a (el [D-Lys3]-GHRP-6), y de dos agentes implicados en las vías de señalización de la PLC/PKC/IP₃ (U73122, inhibidor de la PLC) y de la AC/AMPc/PKA (H89, inhibidor de la PKA), demostramos que estas acciones de la ghrelina en la expresión génica de enzimas digestivas están mediadas por su unión al receptor GHS-R1a, cuya activación parece implicar a ambas vías de señalización, PLC/PKC/IP₃ y AC/AMPc/PKA. Estos hallazgos sugieren que la ghrelina podría intervenir en la regulación de la digestión de macronutrientes en peces.

En segundo lugar, investigamos si la ghrelina interviene en el transporte intestinal de glucosa en los peces. La primera evidencia de una posible relación entre la ghrelina y el transporte intestinal de glucosa la encontramos en la observación de que el intestino del carpín contiene células que coexpresan ghrelina y GLUT2 o SGLT2, GOAT y GLUT2, y

GHS-R1a y GLUT2, SGLT1 o SGLT2 (principales transportadores de glucosa intestinales). Además de la colocación anatómica, hemos demostrado que la expresión génica y proteica de estos tres transportadores de glucosa en el intestino se incrementan significativamente tras la administración intraperitoneal de ghrelina y tras la adición de ghrelina a cultivos de explantes intestinales. La modulación ghrelinérgica de la expresión de los transportadores de glucosa intestinales *in vitro* está mediada por receptores del subtipo GHS-R1a utilizando la cascada de señalización intracelular de la PLC/PKC/IP₃. Además, empleando cultivos de células intestinales aisladas de carpín, hemos observado que la ghrelina no sólo aumenta la expresión de los transportadores de glucosa sino que también es capaz de incrementar la tasa de translocación de GLUT2 a la membrana plasmática de las células intestinales. Estos resultados nos permiten proponer un importante papel facilitador de la ghrelina en la absorción intestinal de glucosa en los peces. De forma complementaria, hemos observado que los niveles circulantes de ghrelina acilada y la expresión génica de *preproghrelina*, *goat* y *ghs-r1* en el intestino resultan incrementadas por la administración intraperitoneal de glucosa, demostrando que este monosacárido es un importante modulador del sistema ghrelinérgico en el carpín.

El último objetivo de este capítulo fue determinar las posibles interacciones de la ghrelina con otros péptidos entéricos (como la CCK, el PYY y el GLP-1) en la regulación de la ingesta en los peces. El estudio de la localización anatómica de estos péptidos y del receptor de ghrelina del tipo GHS-R1a en el intestino del carpín mostró que aproximadamente el 75% de las células enteroendocrinas inmunorreactivas a ghrelina también son positivas para CCK, PYY y/o GLP-1. Además, alrededor del 30% de las células inmunorreactivas a CCK, PYY y GLP-1 también expresan el receptor GHS-R1a, siendo por tanto susceptibles de una modulación por ghrelina. Esta hipotética modulación de anorexígenos entéricos por ghrelina la estudiamos empleando cultivos de explantes primarios intestinales, que demostraron que la ghrelina, a través del receptor GHS-R1a, provoca una disminución significativa en los niveles intestinales de los transcritos de *prepro-cck*, *prepro-pyy* y *proglucagón*, así como de las proteínas PYY y GLP-1. Estos resultados sugieren que en el mecanismo subyacente a la acción orexigénica de la ghrelina podría estar implicado un bloqueo de señales anorexigénicas entéricas. En último lugar, realizamos una aproximación *in vivo* administrando simultáneamente ghrelina y CCK, PYY o GLP-1 y cuantificando la ingesta una hora después de las inyecciones. Los resultados obtenidos demuestran que la administración conjunta de CCK o GLP-1 con ghrelina no modifica significativamente la ingesta, mientras que la administración simultánea de ghrelina y PYY disminuye la ingestión de alimentos. Estos resultados permiten proponer

que mientras la acción anorexigénica de CCK y GLP-1 parece tener una potencia similar a la acción orexigénica de la ghrelina en el carpín, la potencia anorexigénica del PYY es mayor que la acción orexigénica de la ghrelina, al menos en las condiciones de estudio empleadas.

Capítulo 4: Desarrollo de peces cebra deficientes de *preproghrelina*: caracterización de la generación F₀

Hemos empleado la técnica de manipulación genética CRISPR/Cas9 con el fin de generar líneas de peces cebra deficientes del gen *preproghrelina* como una herramienta adicional y de gran importancia para el estudio de las funcionalidades del sistema ghrelinérgico en los peces teleósteos. Si bien la generación de una línea estable *knockout* requiere una serie de cruces selectivos que permitan una transferencia genética vertical, los individuos pertenecientes a la primera generación (F₀), también llamados fundadores, son portadores de una mutación en el gen de *preproghrelina*. Los análisis realizados han demostrado que los peces de la generación F₀ utilizados en esta Tesis presentan niveles de expresión génica de *preproghrelina* considerablemente menores que los individuos salvajes (*wild type*) en al menos los tres tejidos analizados (cerebro, intestino e hígado), así como de expresión proteica en intestino. Como los individuos genéticamente modificados muestran aún un 30-40% de expresión de *preproghrelina*, nos referiremos a ellos como individuos *knockdown* (en lugar de *knockout*). Por tanto, hemos planteado un estudio preliminar comparando los niveles de expresión de diversos genes relacionados con la regulación del apetito y la funcionalidad del sistema digestivo entre los individuos genéticamente modificados y los individuos salvajes.

Los resultados de este estudio muestran que el silenciamiento génico de ghrelina produce importantes cambios en los niveles de expresión de reguladores clave del apetito, de enzimas digestivas y de transportadores de glucosa. En relación a los primeros, hemos observado que los peces cebra *knockdown* para ghrelina muestran en encéfalo mayores niveles de orexígenos (como *agrp*) y menores de anorexígenos (como *pomc* y *cart*) que los peces salvajes. A nivel intestinal, los niveles de *prepro-cck*, *prepro-pyy* y *proglucagón* se encuentran disminuidos en los individuos *knockdown*. En cuanto a las enzimas digestivas, la mutación del gen de *preproghrelina* conduce a una reducción significativa en los niveles de *sacarasa-isomaltasa* y *aminopeptidasa A* en el intestino, y de *lipoproteína lipasa* en el hígado. Por último, los transportadores de glucosa *glut2* y *sglt1* muestran unos niveles de expresión significativamente menores en los individuos *knockdown* que en los salvajes, tanto en el intestino como en el hígado.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral se proponen las siguientes conclusiones:

1. El gen que codifica para la enzima ghrelina O-aciltransferasa del carpín está formado por cuatro exones y tres intrones, cuya transcripción da lugar, al menos, a dos transcritos de ARNm: *goat-V1*, generado por la transcripción total de los exones 1'-2-3, y *goat-V2* generado por *splicing* 3' alternativo en el exón 2. Los elevados niveles de expresión tisular de ambas variantes en el tracto gastrointestinal, y su colocación con ghrelina, apoyan la acilación local de la ghrelina en el intestino del carpín.
2. La presencia de GOAT en el cerebro del carpín indica una posible acilación local de la ghrelina de origen central. Su localización en núcleos del cerebro posterior sugiere que la ghrelina podría estar modulando información sensorial procedente del sistema gustativo, el sistema vestibular e incluso la percepción del dolor.
3. Los ritmos diarios de expresión génica de *goat* hallados en hipotálamo, hipófisis y bulbo intestinal del carpín apoyan la funcionalidad del sistema ghrelinérgico como una salida endocrina del sistema circadiano. La observación de que estos patrones rítmicos sólo se manifiesten en peces alimentados durante la fase diurna del fotociclo sugiere una fuerte relación entre los ritmos de expresión de *goat* y el horario de alimentación.
4. Las importantes variaciones periprandiales observadas en los principales componentes del sistema ghrelinérgico sitúan a la alimentación como un importante regulador de dicho sistema en el carpín. La acil-ghrelina, activando el subtipo de receptor GHS-R1a1, parece actuar como señal iniciadora de la alimentación en esta especie, acción en la cual el bulbo intestinal desempeñaría un papel fundamental.
5. El ayuno es un estimulante de la expresión de *preproghrelina* y *goat* en el telencéfalo y el bulbo intestinal del carpín, donde las acciones estarían mediadas por el receptor GHS-R1a2. El lóbulo vagal, a través de los receptores de tipo 2, también parece estar implicado en las respuestas del sistema ghrelinérgico frente a la falta de alimento.
6. La composición de la dieta modula el sistema ghrelinérgico del carpín, con acciones dependientes de tejido y de la duración del tratamiento, si bien de manera general parece que las dietas ricas en carbohidratos o lípidos inducen la expresión del sistema ghrelinérgico, mientras que una dieta rica en proteínas la disminuye.
7. El silenciamiento de la expresión génica de *preproghrelina* en peces cebras conduce a alteraciones significativas en la expresión génica de importantes reguladores del

apetito, corroborando el papel clave de la ghrelina en la regulación de la ingesta en los peces teleósteos. Las variaciones de expresión observadas en importantes orexígenos (*agrp*) y anorexígenos (*pomc*, *cart*, *prepro-ckk*, *prepro-pyy* y *proglucagon*) sugieren la existencia de mecanismos de compensación ante el déficit de ghrelina.

8. La acción orexigénica de la ghrelina en peces podría estar mediada no sólo por circuitos hipotalámicos sino también por el bloqueo de señales entéricas anorexigénicas, particularmente CCK, PYY y GLP-1. Esta acción de ghrelina podría ser directa en subpoblaciones celulares productoras de cada una de estos reguladores del apetito, ya que en esas células se colocaliza el receptor de ghrelina del subtipo GHS-R1a.
9. La ghrelina parece estar implicada en la regulación de la digestión en los peces, induciendo la expresión de enzimas clave implicadas en este proceso, como son la sacarasa-isomaltasa, aminopeptidasa A, tripsina y lipoproteína lipasa en el intestino y el hígado-páncreas. Esta función parece estar mediada por el receptor GHS-R1a, activando las vías de transducción intracelular de la PLC/PKC/IP₃ o de la AC/AMPc/PKA.
10. La ghrelina contribuye al transporte intestinal de glucosa en los teleósteos mediante la inducción de la expresión de los principales transportadores de glucosa (GLUT2, SGLT1 y SGLT2). Esta acción está mediada por el receptor GHS-R1a y la vía de transducción intracelular de la PLC/PKC/IP₃. Además, esta hormona estimula la translocación de GLUT2 a la superficie de las células intestinales. Nuestros resultados también demuestran que existe una regulación recíproca entre la glucosa y la ghrelina en el carpín, observándose una estimulación por glucosa del sistema ghrelinérgico en este teleósteo.

SUMMARY

INTRODUCTION

Food intake is subject to a complex control that involves numerous neural, endocrine and neuroendocrine regulators. Among them, ghrelin, synthesized mainly by stomach, or its equivalent in stomachless species, is particularly important for being so far the only peripherally-produced peptide exerting a stimulatory effect on food intake. The active form of this hormone requires the attachment of a medium-chain fatty acid to the third serine residue of the peptide, which is catalyzed by the enzyme ghrelin O-acyltransferase (GOAT), located in the membrane of the endoplasmic reticulum. The acylation of ghrelin is essential for the peptide to bind to its main receptor, the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R), conferring GOAT a key role in the functioning of the ghrelinergic system. Currently, many structural and functional aspects of this enzyme remain unknown, especially in fish.

The synthesis and secretion of ghrelin, as well as the functioning of the ghrelinergic system in general, are regulated by several exogenous factors, such as feeding, and endogenous factors, including a hormonal and a neural control. Feeding is the main regulator of the ghrelinergic system in mammals, in which ghrelin is considered to be a meal initiating signal, since its circulating levels increase preprandially and decrease after a meal. In addition, the expression and secretion of this hormone are increased after periods of food deprivation, and are regulated by other aspects related to food intake, such as the feeding pattern and the diet composition. In fish, the possible regulation exerted by feeding on the synthesis and release of ghrelin has been scarcely investigated, and the few available studies show opposite observations in some cases, as occur with the effects of fasting. Besides, very little is known in these vertebrates on the possible role of feeding on other key components

of the ghrelinergic system, such as the GOAT and the GHS-R, regulation that could be of great importance for the functioning of the system.

Ghrelin is a pleiotropic hormone involved in a wide variety of physiological functions, of which its stimulatory action on the release of growth hormone from the pituitary and its effects on the regulation of food intake and energy balance are the most studied. Regarding the regulation of food intake, ghrelin is able to significantly stimulate appetite in most of the vertebrates studied so far, with the exception of birds and some fish species. The stimulation of appetite by ghrelin involves mainly the activation of central orexigenic circuits in both mammals and fish. However, whether the orexigenic action of ghrelin is also due to the activation/inactivation of peripheral systems regulating appetite remains unknown. Ghrelin also participates in the control of food intake indirectly, by regulating intestinal motility and digestive secretions, including gastric acid secretion and pancreatic enzymes, actions that have been described in mammals but remain unknown in fish.

Concerning energy balance, ghrelin has been primarily implicated in the metabolism of glucose in mammals. In fish, some research has linked this hormone to glucose metabolism. Thus, it has been described that ghrelin leads to a situation of hyperglycemia by inhibiting insulin and stimulating glucagon secretion (main hormones responsible for maintaining glucose homeostasis). In addition, ghrelin has been involved in glucosensing mechanisms, as suggested by the fact that it activates glucosensing markers in the hypothalamus and hindbrain of rainbow trout. All these results demonstrate the involvement of ghrelin in the metabolism of glucose in fish, although many aspects of this functionality are yet to be elucidated.

OBJECTIVES

The overall objective of this PhD Thesis is to deepen the knowledge about the functioning of the ghrelinergic system in teleosts, using the goldfish and zebrafish as animal models. To address this general objective, the following specific objectives have been developed:

- Characterization of the goldfish GOAT: given the importance of ghrelin acylation in order to bind to its main receptor, we aim to identify the gene sequence, structure and topology of GOAT. Subsequently, we will analyze its tissue expression pattern, its putative regulation by ghrelin and its daily expression profile.
- Study of the effects of feeding on the goldfish ghrelinergic system: in order to investigate the role of feeding in the regulation of the ghrelinergic system, we aim to

determine the periprandial changes of the system, the effects of short- and long-term fasting and the possible influence of diet composition.

- Characterization of the effects of ghrelin on the regulation of appetite and digestive physiology of the goldfish: we will study the possible involvement of enteric anorexigenic regulators in the orexigenic action of ghrelin. Furthermore, we will analyze for the first time in fish the possible effects of this hormone in the regulation of digestive enzyme expression and in the intestinal absorption of glucose.
- Development of a transgenic zebrafish line lacking *preproghrelin*: a genetic approach will be used to deepen the study of the functionality of the ghrelinergic system in teleosts. For this purpose, we will initiate the development of zebrafish lacking *preproghrelin*, and using fish from the F₀ generation, we aim to study how ghrelin gene silencing affects the expression of central and peripheral appetite regulators, digestive enzymes and glucose transporters.

RESULTS

Results of this PhD Thesis have been structured in four chapters summarized as follows:

Chapter 1: Identification and characterization of the goldfish GOAT

The first objective of this chapter was focused on the sequence identification of the goldfish *goat* using PCR and rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends (RACE) techniques. Results obtained revealed the existence of two mRNA transcripts (1491 and 1413 bp) named *goat-V1* and *goat-V2*. We found that the goldfish *goat* gene contains four exons and three introns and that shows a peculiar transcription pattern, because it is the exon 1' to be transcribed of the first two exons (exon 1' and exon 1), unlike the majority of vertebrates which transcribe the exon 1. The two variants of *goat* identified codify for proteins of 393 and 367 amino acid, respectively, with a high degree of identity with the GOAT from the rest of vertebrates. Using bioinformatic tools, we observed that both GOAT-V1 and V2-GOAT are integral membrane proteins, with 11 and 9 transmembrane domains, respectively, and have the two amino acids key for the functionality of the enzyme (asparagine-307 and histidine-338) at similar topological positions respect to the mammalian GOAT and other membrane-bound O-acyltransferases.

Our next aim was to study the tissue expression pattern of the two variants of *goat* in central and peripheral tissues using RT-qPCR. Both variants show a similar tissue

expression pattern, with the highest levels detected in the gonads and the gastrointestinal tract. The protein expression of GOAT in intestinal regions was confirmed by immunohistochemistry, observing that a subset of cells within the intestinal mucosa coexpresses GOAT and ghrelin, which indicates that the acylation of ghrelin can take place locally in the goldfish intestine. Similarly, we studied the anatomical distribution of the GOAT in the brain, and found that the highest levels of the enzyme were located in the posterior brain, including the vagal lobe and some fiber tracts. Other brain areas expressing GOAT, although at lower levels, are the telencephalon, some hypothalamic nuclei, the pineal gland, the optic tectum and the cerebellum.

As an approach to study the regulatory mechanisms underlying GOAT expression, we studied whether the intestinal expression of the enzyme is regulated by its substrate, ghrelin. Using a culture system of goldfish primary intestinal explants exposed to different concentrations of acylated ghrelin, we observed that the hormone exerts a time-dependent inhibition on the gene and protein expression of GOAT. These observations suggest that GOAT, like other acyltransferases, is controlled by end-product inhibition.

Finally, we studied the possible rhythmicity in the expression of *goat* and the influence of feeding time. We observed that *goat* expression exhibits a rhythmic oscillation in the hypothalamus, pituitary gland and intestinal bulb of fish fed during the photophase, with the maximum levels (acrophase) observed during the nocturnal phase in the three tissues. These rhythmic patterns were not detected when the fish were fed during the scotophase, which demonstrates that the daily rhythms of *goat* expression are strongly related with feeding time. The rhythmic response of *goat* suggests a possible role of the ghrelinergic system as an output of the circadian system in fish.

Chapter 2: The role of feeding in the regulation of the ghrelinergic system in goldfish

The first objective was to study the possible periprandial changes in the different components of the ghrelinergic system. The results show a sharp preprandial increase in circulating acyl-ghrelin (but not desacyl-ghrelin) and GOAT, suggesting that acyl-ghrelin might be acting as a meal initiating signal in goldfish. This conclusion is supported by the preprandial increase in the expression of *preproghrelin* in intestinal bulb. The fact that *ghs-rlal* transcripts are also increased preprandially suggests that this receptor subtype would be involved in this proposed action. The postprandial variations observed in the expression of most of the components of the ghrelinergic system in the telencephalon and vagal lobe reinforce the relevance of feeding in the regulation of this system.

Secondly, we analyzed the variations in the ghrelinergic system induced by short-term (7 days) and long-term (30 days) fasting. Results obtained reveal that the fasting periods analysed do not alter circulating levels of ghrelin (acylated and deacylated) and GOAT, unlike general observations published in mammals. However, we found that food deprivation leads to significant increases in the expression of *preproghrelin* and *goat* in telencephalon and intestinal bulb. The analysis of the responses of the ghrelin receptors to fasting show a differential involvement of the different receptor subtypes, being the GHS-R1a subtype the most affected in the telencephalon and intestinal bulb. The vagal lobe also seems to be important in the responses of the ghrelinergic system to fasting, being the type 2 receptors the ones overexpressed by fasting in this tissue.

Finally, we studied whether changes in the diet composition can alter the ghrelinergic system in the goldfish. For this, fish were fed on diets enriched in carbohydrates, proteins or lipids. Results of this work show that the different macronutrients exert a differential regulation of the expression of the ghrelinergic system, which seems to be dependent on the organ. Thus, both high-carbohydrate and high-lipid diets lead to significant increases in the expression of *preproghrelin*, *goat* and *ghs-r1a* in the pituitary, while none of them induce changes in gene expression in the hypothalamus. In the digestive system, long-term feeding on a high-carbohydrate diet induces the expression of *goat* and *ghs-r1* in the anterior intestine, but not in the liver. On the other hand, a high-protein diet does not modify the ghrelinergic system in the anterior intestine, but leads to a decrease in the expression of *preproghrelin* and *ghs-r1* in the liver within a week.

Chapter 3: Ghrelin as a modulator of the functionality of the digestive system in goldfish

This chapter was conducted to investigate potential new roles of ghrelin related to digestion and nutrient absorption, as well as to study the mechanisms underlying the orexigenic actions of this hormone in goldfish.

The first objective was to examine whether ghrelin is involved in the modulation of digestive enzymes, particularly the carbohydrase sucrase-isomaltase, the proteases aminopeptidase A and trypsin, and the lipoprotein lipase. As a first approach we performed an immunohistochemical study which revealed the presence of cells coexpressing ghrelin and each of the digestive enzymes, as well as cells colocalizing GHS-R1a and digestive enzymes, in the intestine and liver of goldfish. This observation suggests a possible interaction between the ghrelinergic system and the studied digestive enzymes, hypothesis that was investigated by conducting cultures of primary intestinal and hepatopancreatic explants

exposed to different concentrations of acylated ghrelin. Results show that ghrelin stimulates the expression of the majority of the digestive enzymes studied in the goldfish intestine and liver *in vitro*, being this effect dependent on the concentration and the incubation time. Among the different enzymes studied, the most notable effects of ghrelin were observed for the sucrase-isomaltase, which could indicate a particular involvement of this hormone in the digestion of carbohydrates. Making use of a GHS-R1a antagonist (the [D-Lys3]-GHRP-6) and inhibitors of two agents involved in the PLC/PKC/IP₃ (U73122, a PLC inhibitor) and the AC/AMPc/PKA (H89, a PKA inhibitor) signaling pathways, we demonstrated that the actions of ghrelin on digestive enzyme expression are mediated by binding to GHS-R1a and the triggering of the PLC/PKC/IP₃ and AC/AMPc/PKA pathways. These findings suggest that ghrelin might play a role in the regulation of nutrient digestion in fish.

Secondly, we investigated whether ghrelin is involved in intestinal glucose transport in fish. The first evidence of a possible crosstalk between ghrelin and intestinal glucose transport is found in the observation that the goldfish intestine contains cells coexpressing ghrelin and GLUT2 or SGLT2, GOAT and GLUT2, and GHS-R1a and GLUT2, SGLT1 or SGLT2 (main intestinal glucose transporters). In addition to the anatomical colocalization, we showed that the gene and protein expression of these three glucose transporters in the intestine increase significantly after intraperitoneal administration of acyl-ghrelin and the addition of the hormone to intestinal explant cultures. The ghrelinergic modulation of glucose transporters *in vitro* is mediated by GHS-R1a triggering the PLC/PKC/IP₃ intracellular signaling pathway. In addition, using cultured intestinal cells isolated from goldfish, we observed that ghrelin not only upregulates the expression of glucose transporters but also increases the rate of GLUT2 translocation into the plasma membrane of intestinal cells. These results allow us to propose an important facilitating role of ghrelin in the intestinal absorption of glucose in fish. On a complementary basis, we observed that circulating levels of acylated ghrelin and intestinal gene expression of *preproghrelin*, *goat* and *ghs-r1* are increased by the intraperitoneal administration of glucose, indicating that this monosaccharide is an important modulator of the ghrelinergic system in goldfish.

The last goal of this chapter was to determine possible interactions between ghrelin and other enteric peptides (such as CCK, PYY and GLP-1) in the regulation of food intake in fish. The study of the anatomical location of these peptides and GHS-R1a in the goldfish intestine revealed that around 75% of the ghrelin-immunoreactive enteroendocrine cells are also positive for CCK, PYY or GLP-1. In addition, around 30% of the cells immunoreactive to CCK, PYY and GLP-1 also express GHS-R1a, being therefore susceptible to a modulation by ghrelin. We studied this hypothetical ghrelinergic modulation of enteric

anorectics by using cultures of primary intestinal explants, which revealed that ghrelin, by binding to the GHS-R1a, causes a significant decrease in the intestinal transcript levels of *prepro-ckk*, *prepro-pyy* and *proglucagon* and protein levels of PYY and GLP-1. These results suggest that the orexigenic action of ghrelin might include the blockade of enteric anorexigenic signals. Finally, we performed an *in vivo* approach coadministering ghrelin and CCK, PYY or GLP-1, and quantifying food intake one hour post-injections. The results obtained show that the coadministration of CCK or GLP-1 with ghrelin does not modify food intake, while the coadministration of ghrelin and PYY decreases food intake. These results indicate that the degree of food intake inhibition exerted by CCK and GLP-1 in goldfish is similar to the degree of food intake stimulation exerted by ghrelin, whereas PYY anorexigenic potency is greater than ghrelin orexigenic action, at least under the conditions employed in this study.

Chapter 4: Development of *preproghrelin* knockout zebrafish: characterization of the F₀ generation

Here we employed the genetic engineering technique CRISPR/Cas9 to generate zebrafish lines lacking *preproghrelin* as an additional and valuable tool for the study of the functions of the ghrelinergic system in teleosts. Although the generation of a stable *knockout* line requires a series of selective breeding that allow a vertical gene transfer, individuals belonging to the first generation (F₀), also named founders, carry a mutation in the *preproghrelin* gene. The analysis performed have shown that the fish from the F₀ generation used in this PhD have considerably lower *preproghrelin* mRNA levels than the *wild-type* individuals in at least the three analyzed tissues (brain, intestine and liver), as well as lower protein expression in the intestine. As genetically-modified fish still express a 30-40% of *preproghrelin*, we will refer to them as *knockdown* (instead of *knockout*). In view of this, we proposed a preliminary study comparing the expression levels of several genes related to the regulation of appetite and digestive system functionality between *wild-type* and *knockdown* fish.

Results from this study show that ghrelin gene silencing leads to significant changes in the expression levels of key appetite-regulators, digestive enzymes and glucose transporters. Regarding the former, we have observed that *preproghrelin knockdown* zebrafish have higher levels of orexigens (such as *agrp*) and lower levels of anorexigens (as *pomc* and *cart*) in the brain when compared to *wild-type* fish. In the intestine, *prepro-ckk*, *prepro-pyy* and *proglucagon* mRNA levels are diminished in *knockdown* fish. Concerning the digestive enzymes, *preproghrelin* gene mutation leads to a significant reduction in the levels of *sucrase*-

isomaltase and *aminopeptidase A* in the intestine, and of *lipoprotein lipase* in the liver. Finally, expression of *glut2* and *sgl1* is significantly low in *knockdown* compared to *wild-type* fish, in both intestine and liver.

CONCLUSIONS

From the results obtained in the present PhD Thesis we propose the following conclusions:

1. The gene encoding the enzyme ghrelin O-acyltransferase in goldfish consists of four exons and three introns, whose transcription results in, at least, two mRNA transcripts: *goat-V1*, generated by the full transcription of the exons 1'-2-3, and *goat-V2*, generated by 3' alternative splicing at exon 2. The high expression levels of both variants in the gastrointestinal tract, and their colocalization with ghrelin, support local acylation of ghrelin in the goldfish intestine.
2. The presence of GOAT in the goldfish brain indicates a possible local acylation of central ghrelin. Its location in nuclei within the posterior brain suggests that ghrelin could be modulating sensory information from the gustatory system, the vestibular system, and even the perception of pain.
3. The daily rhythms of *goat* expression found in the hypothalamus, pituitary and intestinal bulb of goldfish support the functionality of the ghrelinergic system as an endocrine output of the circadian system. The observation that these rhythmic patterns are only displayed in fish fed during the photophase suggests a strong relationship between the rhythms of *goat* expression and feeding time.
4. The important periprandial variations in the circulating and expression levels of the main components of the ghrelinergic system in goldfish postulate feeding as an important regulator of the system. Acyl-ghrelin appears to act as a meal initiator signal in this species, acting via the GHS-R1a1 receptor subtype. The intestinal bulb seems to have a key role in this action.
5. Fasting is able to induce *preproghrelin* and *goat* expression in the goldfish brain and intestinal bulb, where ghrelin actions would be mediated by the GHS-R1a2 receptor subtype. The vagal lobe, via type 2 receptors, also seems to be involved in the responses of the ghrelinergic system to food scarcity.
6. Diet composition modulates the goldfish ghrelinergic system exerting actions which are dependent on the tissue and the duration of treatment. Nevertheless, in general

terms, it seems that high-carbohydrate and high-lipid diets induce the expression of the ghrelinergic system, while a high-protein diet decreases it.

7. *Preproghrelin* gene silencing in zebrafish leads to significant alterations in the gene expression of important appetite-regulators, confirming the key role of ghrelin in the regulation of food intake in teleosts. The changes in expression observed for important orexigens (*agrp*) and anorexigens (*pomc*, *cart*, *prepro-ckk*, *prepro-pyy* and *proglucagon*) suggest the existence of compensatory mechanisms against the ghrelin deficit.
8. The orexigenic action of ghrelin in fish could be mediated not only by hypothalamic circuits but also by blocking enteric anorexigenic signals, particularly CCK, PYY and GLP-1. This ghrelin action might be direct in subsets of cells producing each of these appetite-regulators, which colocalize GHS-R1a.
9. Ghrelin seems to be involved in the regulation of digestion in fish, by inducing the expression of key enzymes involved in this process, such as sucrase-isomaltase, aminopeptidase A, trypsin and lipoprotein lipase in the intestine and hepatopancreas. This action appears to be mediated by GHS-R1a, triggering the PLC/PKC/IP₃ or AC/AMPc/PKA intracellular signaling pathways.
10. Ghrelin contributes to intestinal glucose transport in teleosts by inducing the expression of the main glucose transporters (GLUT2, SGLT1 and SGLT2). This action is mediated by GHS-R1a and the PLC/PKC/IP₃ intracellular signaling pathway. Ghrelin also stimulates GLUT2 translocation into the surface of intestinal cells. Our results also show that there is a reciprocal regulation between glucose and ghrelin in goldfish, as indicated by the stimulatory effect of glucose on the ghrelinergic system in this teleost.



ABREVIATURAS

12L:12D	12 horas de luz : 12 horas de oscuridad	CRH	Hormona liberadora de corticotropina
[D-Lys³]-GHRP-6	Del inglés, <i>[D-Lys³]-Growth Hormone Releasing Peptide 6</i> . Péptido liberador de hormona de crecimiento 6 [D-Lys ³]	CRISPRs	Del inglés, <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> . Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interesparciadas
A	Adenina	Ct	Ciclo umbral
AC	Adenilato ciclasa	DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
AgRP	Péptido relacionado con Agouti	DEPC	Dietil pirocarbonato
ADN	Ácido desoxirribonucleico	DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco
ADNasa	Desoxirribonucleasa	DMN	Núcleo dorsomedial
ADNc	ADN complementario	dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	DTT	Ditiotreitol
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP	ECL	Del inglés, <i>enhanced chemiluminescence</i> . Quimioluminiscencia mejorada
ARC	Núcleo arqueado	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ARN	Ácido ribonucleico	ELISA	Enzimoimmunoensayo o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ARNasa	Ribonucleasa	EXPASY	Del inglés, <i>Expert Protein Analysis System</i>
ARNm	ARN mensajero	FBS	Suero fetal bovino
ARNr	ARN ribosómico	FITC	Isotiocianato de fluoresceína
BCA	Ácido bicinonínico	G	Guanina
BLAST	Del inglés, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> dds	GH	Hormona de crecimiento
BSA	Albúmina de suero bovino	GHS-R	Receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento
C	Citosina	GLP-1	Péptido análogo a glucagón-1
CART	Tránsito regulado por anfetamina y cocaína	GLUT	Transportador de glucosa por difusión facilitada
Cas	Del inglés, <i>CRISPR associated protein</i> . Proteína asociada a CRISPR	GOAT	Ghrelin O-aciltransferasa
CCK	Colecistocinina		
CoA	Coenzima A		
crARN	ARN transcrito de CRISPR		

HDR	Reparación del ADN directa por homología	OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico	ORF	Del inglés, <i>Open Reading Frame</i> . Marco abierto de lectura
HRP	Peroxidasa de rábano	PAM	Motivo adyacente a los protoespaciadores
IgG	Inmunoglobulina G	PAGE	Electroforesis en gel de acrilamida
IP	Intraperitoneal	PBS	Tampón fosfato salino
IP₃	Inositol trifosfato	pb	Pares de bases
LB	Luria Bertani	PCR	Del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa
LHA	Área hipotalámica lateral	PFA	Área perifornical
MAPK	MAP quinasa	PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
MBOATs	O-aciltransferasas unidas a membrana	PKA	Proteína quinasa A
MCH	Hormona concentradora de melanina	PKC	Proteína quinasa C
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico	PLC	Fosfoldasa C
MS-222	Tricaína-metanosulfonato	POMC	Proopiomelanocortina
MSH	Hormona estimulante de melanocitos	PSA	Persulfato amónico
mTOR	Del inglés, <i>mammalian target of rapamycin</i> . Mecanismo diana de rapamicina en células de mamíferos	PYY	Péptido tirosina-tirosina
NCBI	Del inglés, <i>National Center for Biotechnology Information</i>	PVN	Núcleo paraventricular
NHEJ	Reparación del ADN mediante unión de extremos no homólogos	RACE	Amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del ADNc
NPO	Núcleo preóptico	RT	Retrotranscripción
NPPv	Núcleo posterior periventricular	RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
NPY	Neuropéptido Y	SDS	Dodecil-sulfato sódico
NRL	Núcleo del receso lateral	SGLT	Cotransportador sodio-glucosa
NTA	Núcleo tuberal anterior	T	Tirosina
NTL	Núcleo tuberal lateral	TAE	Tris-Acetato-EDTA
NTP	Núcleo tuberal posterior	TBE	Tris-Borato-EDTA
NTS	Núcleo del tracto solitario	TBS	Tampón tris salino
		TMB	Tetrametilbencidina
		TEMED	Tetrametiletildiamina

tracrARN	ARN transactivador de crARN
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
UV	Ultravioleta
VMN	Núcleo ventromedial
ZT	Tiempo <i>zeitgeber</i>



INTRODUCCIÓN

1. REGULACIÓN DE LA INGESTA

La ingesta es un proceso complejo resultante de la interacción entre numerosos factores fisiológicos y ambientales, cuyo acto final es la captura e ingestión de alimento. Esta toma de alimentos determina en buena medida la tasa de crecimiento de los animales, satisfaciendo sus requerimientos metabólicos y nutricionales (De Silva y Trevor, 1995). La ingesta está sometida a una compleja regulación en la que intervienen un sistema central, que integra información metabólica, endocrina, neuroendocrina y circadiana, y un sistema periférico, principal regulador de la saciedad (**Figura 1**). De este modo, el control de la ingesta depende de la capacidad del cerebro para recibir e integrar una amplia variedad de señales, tanto de origen central como periférico, indicadoras del estado nutricional y del nivel de energía del organismo, y generar una respuesta determinante del grado de ingestión de alimento (Näslund y Hellström, 2007; Lenard y Berthoud, 2008; Magni *et al.*, 2009; Sam *et al.*, 2012). El sistema nervioso autónomo, y sus divisiones parasimpática y simpática, son imprescindibles para la comunicación entre los centros reguladores del apetito centrales y periféricos (revisado en Sobrino Crespo *et al.*, 2014).

Se pueden considerar dos sistemas complementarios encargados de la regulación la ingesta, uno que funciona a corto plazo y otro a largo plazo (revisado en Palou *et al.*, 2004; Chiquete y Tolosa, 2013; Morton *et al.*, 2014). La regulación a corto plazo intenta graduar la ingesta de alimento esencialmente como adaptación al volumen de éste y al tipo de nutrientes ingeridos. En este sistema intervienen fundamentalmente una serie de señales mecánicas (como la distensión gástrica) y químicas (derivadas de la composición de los nutrientes y de cambios osmóticos producidos en el intestino como resultado del proceso digestivo), así como una variedad de péptidos gastrointestinales que se liberan en ausencia o

presencia de alimento, actuando como señales de hambre o saciedad (respectivamente). Entre estos péptidos, en los mamíferos está bien establecido el importante papel desempeñado por la ghrelina como señal de inicio de la alimentación. En términos de saciedad, péptidos como la colecistocinina (CCK), el péptido similar al glucagón (GLP-1), la oxintomodulina, y el péptido tirosina-tirosina (PYY), entre otros, inducen saciedad a través de relevos vagales aferentes al cerebro. La regulación a largo plazo, por su parte, implica mecanismos neuroendocrinos que intentan graduar la ingesta de alimento esencialmente como adaptación al nivel de adiposidad, es decir, en respuesta al nivel de almacenamiento energético de largo plazo. Este sistema involucra a centros encefálicos encargados de mantener el balance energético por largos períodos, que señalizan esencialmente información procedente de hormonas como la insulina (secretada en el páncreas) y la leptina (secretada en el tejido adiposo o, en el caso de los peces, en el hígado). Los límites entre los mecanismos de regulación a corto y largo plazo no están bien definidos, especialmente en los peces, estando implicadas señales de saciedad en mecanismos de regulación a largo plazo, y viceversa.

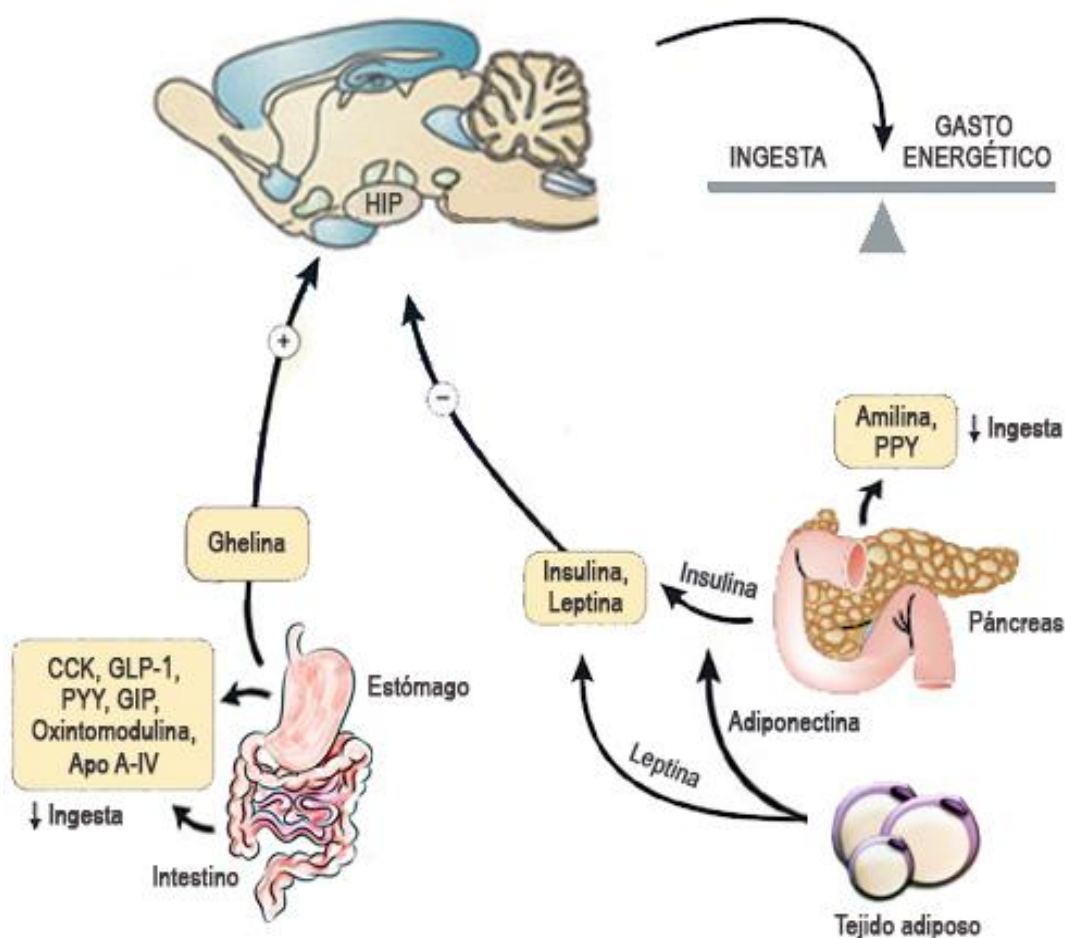


Figura 1. Representación esquemática de la interacción de los principales sistemas centrales y periféricos que intervienen en la regulación de la ingesta en mamíferos. Apo A-IV, apolipoproteína A-

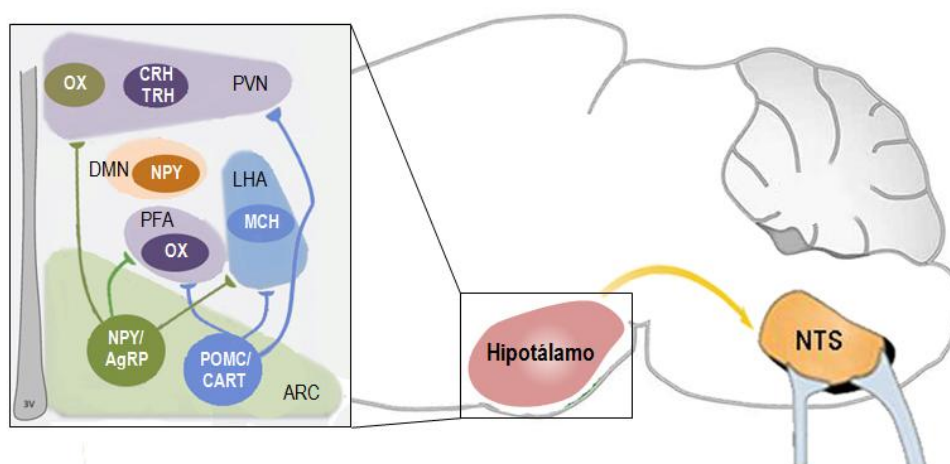
IV; CCK, colecistocinina; GIP, péptido inhibidor gástrico; GLP-1, péptido similar a glucagón-1; HIP, hipotálamo; PPY, polipéptido pancreático; PYY, péptido tirosina-tirosina.

Como se indicó anteriormente, la regulación de la ingesta a corto plazo, y en menor medida la regulación a largo plazo, están sometidas a una regulación metabólica (Havel, 2001; Conde-Sieira y Soengas, 2016). En ella, tras la ingesta, los nutrientes procedentes de la dieta presentes en el estómago y en la zona proximal del intestino activan quimiorreceptores que producen señales aferentes que viajan por las fibras del nervio vago y provocan la inhibición de la ingesta. Además, los nutrientes que llegan por la vena portal también pueden desencadenar señales vagales aferentes desde el hígado. De este modo, los niveles de glucosa, lípidos y aminoácidos pueden modular la ingesta de alimento limitando la cantidad de comida ingerida en una toma. En mamíferos (Le Foll *et al.*, 2009; Blouet y Schwartz, 2010; Watts y Donovan, 2010), y recientemente también en peces (Librán-Pérez *et al.*, 2012; Soengas, 2014; Conde-Sieira *et al.*, 2015; Conde-Sieira y Soengas, 2016), se ha descrito la existencia de mecanismos sensores centrales y periféricos que informan de la disponibilidad de nutrientes como la glucosa y los ácidos grasos. El principal centro de integración de las múltiples señales nutricionales es el hipotálamo. La detección hipotalámica de nutrientes, de forma directa o indirecta mediante información aferente, resulta en la inhibición de la ingesta a través de cambios en la expresión de neuropéptidos orexigénicos y anorexigénicos. Además, el sistema central sensor de nutrientes modula funciones periféricas, como la homeostasis de la glucosa, el metabolismo hepático y el metabolismo del tejido adiposo (Morton *et al.*, 2006; Conde-Sieira y Soengas, 2016).

1.1. Circuitos centrales que intervienen en la regulación de la ingesta

Los primeros métodos de estudio relativos a los centros centrales implicados en la regulación de la ingesta consistían en lesionar zonas cerebrales concretas y evaluar los cambios comportamentales que experimentaban los animales. Estos estudios han revelado que el **hipotálamo**, y más específicamente áreas concretas dentro de éste, tienen un papel crucial en la regulación del apetito tanto en los mamíferos (Anand y Brobeck, 1951; Bernardis y Bellinger, 1993) como en los peces (Roberts y Savage, 1978; Peter, 1979). Posteriormente, se ha demostrado la existencia de varios circuitos centrales interconectados en la regulación del comportamiento alimentario (Elmqvist *et al.*, 1999). Así, aunque el hipotálamo desempeña un papel crucial en la regulación de la ingesta, otras áreas encefálicas también están implicadas, junto a un elevado número de neurotransmisores, neuropéptidos y hormonas que interaccionan entre sí de forma compleja (Majdic, 2009; Yeo y Heisler, 2012) (**Figura 2**).

Mamíferos



Peces

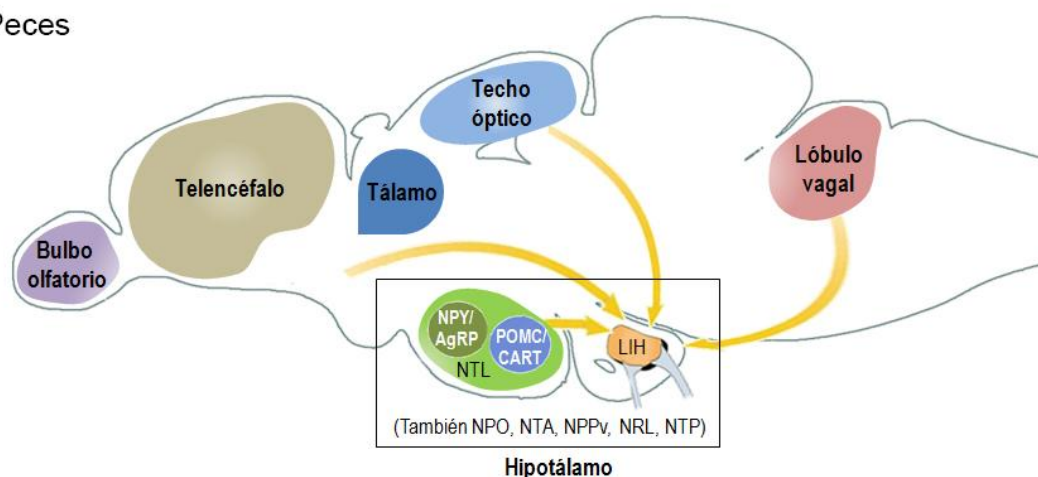


Figura 2. Representación esquemática de las principales áreas cerebrales (en negro) y péptidos (en blanco) que intervienen en la regulación de ingesta en los mamíferos y peces. AgRP, péptido relacionado con agouti; ARC, núcleo arqueado; CART, transcrito regulado por anfetamina y cocaína; CRH, hormona liberadora de corticotropina; DMN, núcleo dorsomedial; LHA, área hipotalámica lateral; LIH, lóbulo hipotalámico inferior; MCH, hormona concentradora de melanina; NTL, núcleo tuberal lateral; NPO, núcleo preóptico; NPPv, núcleo periventricular posterior; NTA, núcleo tuberal anterior; NTP, núcleo tuberal posterior; NPY, neuropéptido Y; NRL, núcleo del receso lateral; NTS, núcleo del tracto solitario; OX, oxitocina; PFA, área perifornical; POMC, proopiomelanocortina; PVN, núcleo paraventricular; TRH, hormona liberadora de tirotropina.

En el hipotálamo existe una compleja red de circuitos orexigénicos y anorexigénicos conectados anatómicamente y funcionalmente que integran señales procedentes tanto de otras regiones encefálicas como de la periferia. Uno de los núcleos reguladores de la ingesta más importantes a nivel hipotalámico es el **núcleo arqueado** (ARC), cuyo equivalente en peces es el **núcleo tuberal lateral** (NTL). En esta región se diferencian dos poblaciones de neuronas: un grupo de neuronas orexigénicas que sintetizan y liberan **neuropéptido Y** (NPY) y **péptido relacionado con Agouti** (AgRP), y un grupo de neuronas anorexigénicas que producen y liberan **proopiomelanocortina** (POMC), cuyos péptidos bioactivos derivados más importantes

son las **melanocortinas**, como la **hormona estimulante de melanocitos (MSH)** y el **tránsito regulado por anfetamina y cocaína (CART)** (Kalra *et al.*, 1999; Cerdá-Reverter y Peter, 2003; Sobrino Crespo *et al.*, 2014; Joly-Amado *et al.*, 2014; Porter, 2015). Estas poblaciones neuronales se encuentran interconectadas entre sí, de modo que la estimulación del apetito producida por AgRP/NPY conlleva la inhibición de las melanocortinas/CART (Yeo y Heisler, 2012). Las respuestas generadas por el ARC están moduladas fundamentalmente por señales periféricas de adiposidad lideradas por la leptina y la insulina (Schwartz *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2006), así como por señales procedentes del tracto gastrointestinal, fundamentalmente la ghrelina y la CCK.

En los mamíferos, los axones de las neuronas del ARC proyectan principalmente sobre el **núcleo paraventricular (PVN)**, el **área hipotalámica lateral (LHA)** y el **área perifornical (PFA)** del hipotálamo (Joly-Amado *et al.*, 2014). El PVN contiene neuronas que sintetizan y liberan sustancias anorexigénicas, como la **oxitocina**, la **hormona liberadora de corticotropina (CRH)** y la **hormona liberadora de tirotropina (TRH)**. En los peces, el **núcleo preóptico (NPO)** del hipotálamo es considerado el homólogo funcional del PVN de los mamíferos (Herget *et al.*, 2014), si bien algunos autores consideran que sólo la porción magnocelular del área preóptica sería homóloga. En este NPO se han identificado neuronas de **CRH** (Ando *et al.*, 1999), **TRH** (Díaz *et al.*, 2002) y **orexinas** (Kaslin *et al.*, 2004). Asimismo, una densa población de neuronas productoras de NPY también se ha localizado en el área preóptica del hipotálamo (Danger *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1994; Porter *et al.*, 2015). Por el contrario, en el LHA y en el PFA se producen y liberan sustancias orexigénicas, como la **hormona concentradora de melanina (MCH)** y **orexinas**, respectivamente (Majdic, 2009; Sobrino Crespo *et al.*, 2014). La liberación de sustancias orexigénicas o anorexigénicas por las neuronas de segundo orden del PVN, LHA o del PFA dependerá del resultado de la integración de las señales periféricas a nivel del ARC.

Si bien los núcleos PVN, LHA y PFA de los mamíferos reciben la mayor parte de las proyecciones procedentes del ARC, una parte de las mismas se dirige a otros dos núcleos hipotalámicos importantes, el **núcleo dorsomedial (DMN)** y el **núcleo ventromedial (VMN)** (Jhanwar-Uniyal *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2000; Joly-Amado *et al.*, 2014). El DMN, al igual que el ARC, contiene una importante población de neuronas que expresan NPY e inervan de manera directa al PVN (Yang *et al.*, 2009; Loh *et al.*, 2015). Respecto al VMN, a pesar de haber sido considerado como el centro de saciedad en los primeros estudios sobre los circuitos implicados en la regulación de la ingesta (Anand y Brobeck, 1951; Bray *et al.*, 1990), no existen evidencias de la producción de señales orexigénicas o anorexigénicas en dicho núcleo. En los peces, no se ha descrito un núcleo con homología funcional al DMN. Sin embargo, el

denominado **núcleo tuberal anterior** (NTA) se considera como el homólogo del VMN de los mamíferos, por las proyecciones que recibe procedentes de la porción magnocelular del área preóptica (Forlano y Cone, 2007).

En los peces, cabe citar otros núcleos hipotalámicos implicados en el control de la ingesta, que no muestran una evidente homología funcional con núcleos de mamíferos. Estos son:

- 1) El **núcleo periventricular posterior** (NPPv), donde se localizan neuronas productoras de NPY (Kojima *et al.*, 2009; 2010), α -MSH (Pandolfi *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2010) y MCH (Pandolfi *et al.*, 2003; Matsuda, 2009), que interaccionan con neuronas del NTL regulando el comportamiento alimentario a través de un circuito de inhibición recíproca (Kojima *et al.*, 2010). Poblaciones neuronales productoras de orexinas en este NPPv también podrían estar asociadas al control de la ingesta (Nakamachi *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2009).
- 2) El **núcleo del receso lateral** (NRL), localizado en el hipotálamo medio-basal, presenta un importante número de neuronas relacionadas con el control de la ingesta, especialmente neuronas de orexinas (Nakamachi *et al.*, 2006; Kojima *et al.*, 2009), de AgRP (Cerdá-Reverter y Peter, 2003), y relacionadas con el sistema de melanocortinas, POMC (Cerdá-Reverter *et al.*, 2003), α -MSH (Amano *et al.*, 2005) y MCH (Shimakura *et al.*, 2008).
- 3) El **núcleo tuberal posterior** (NTP), donde se han encontrado neuronas MCH (Shimakura *et al.*, 2008), TRH (Díaz *et al.*, 2002) y neuronas orexinérgicas (Kaslin *et al.*, 2004).

La información de la mayoría de todos estos núcleos llega a centros que, gracias a la recepción de información sensorial periférica y conexiones recíprocas con las regiones encefálicas mencionadas, cumplen un importante papel integrador con el fin de modular el comportamiento alimentario general. En los mamíferos, el principal centro de integración es el **núcleo del tracto solitario** (NTS) (Grill y Hayes, 2009; Majdic *et al.*, 2009), situado en el tronco del encéfalo, el cual recibe inervación desde los núcleos ARC, PVN, LHA y DMN (Joly-Amado *et al.*, 2014), señales de saciedad periféricas (Porte *et al.*, 2002; Baptista *et al.*, 2005), aferencias del vagales procedentes del tracto gastrointestinal (Holtmann y Talley, 2014) e información gustativa (Morton *et al.*, 2006). En los peces, es el **lóbulo inferior** del hipotálamo quien actúa como centro de integración en el control de la ingesta (Rink y Wullimann, 1998; Wullimann y Mueller, 2004), de modo similar a como actúa el NTS en los mamíferos.

La relación de agentes hipotalámicos implicados en la regulación de ingesta es mucho más amplia. Así, en los mamíferos cabe destacar a los péptidos orexigénicos de la familia de la **galanina** (Fang *et al.*, 2011; 2012) y la **cerebelina-1** (Gardiner *et al.*, 2010), y los anorexigénicos **neurotensina** (Sahu *et al.*, 2001; Ratner *et al.*, 2016), **urocortinas** (Pan y Kastin, 2008; Stengel y Taché, 2014), **nesfatina-1** (Ayada *et al.*, 2015; Stengel, 2015) y **taquicininas** (Sahu *et al.*, 1988; Kalra *et al.*, 1991). La superfamilia de **péptidos RF-amida** incluye péptidos tanto orexigénicos como anorexigénicos (Bechtold y Luckman, 2007; Findeisen *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2015). La mayoría de estos neuropéptidos también han sido identificados en los peces (Volkoff *et al.*, 2009; Volkoff, 2016) y muestran funciones reguladoras de la ingesta similares a las de los mamíferos. Entre ellos se encuentran la **galanina** y el **péptido similar a galanina** (Volkoff y Peter, 2001; Mensah *et al.*, 2017), la **urotensina I** (homóloga a las urocortinas de los mamíferos; Bernier y Peter, 2001) y la **nesfatina-1** (Gonzalez *et al.*, 2010; Kerbel y Unniappan, 2012). Sin embargo, en la actualidad se desconoce si péptidos como la **neurotensina** (Magliulo-Cepriano *et al.*, 1993; Levitas-Djerbi *et al.*, 2015), ciertas **taquicininas** (Jensen y Conlon, 1992; Lin y Peter, 1997) y **péptidos FR-amida** (Sawada *et al.*, 2002; Moriyama *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2015), descritos en los peces, están implicados en la regulación de la ingesta.

Si bien el hipotálamo desempeña un papel crucial en la regulación de la ingesta, otras áreas cerebrales intervienen de manera importante en dicho proceso, fundamentalmente en peces. La **hipófisis** de estos vertebrados contiene una gran cantidad de neuronas que expresan péptidos que intervienen en la regulación de la ingesta, como NPY (Danger *et al.*, 1991; Gaikwad *et al.*, 2004), POMC (Porter *et al.*, 2015), α -MSH (Amano *et al.*, 2005) y MCH (Amano *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios pioneros de lesiones y estimulación de áreas cerebrales mostraron que lesiones en los **lóbulos y tractos olfatorios**, el **telencéfalo** y el **techo óptico** modificaban el comportamiento alimentario en los peces, sugiriendo su implicación en el control de la ingesta (Grimm, 1960; Peter, 1979; Stacey y Kyle, 1983). Posteriormente, varios estudios han demostrado la presencia de algunos de los principales neuropéptidos involucrados en la regulación de la ingesta en dichas regiones, como NPY, CART (Akash *et al.*, 2014; Porter *et al.*, 2015), α -MSH (Amano *et al.*, 2005), MCH (Pandolfi *et al.*, 2003; Matsuda *et al.*, 2007), TRH (Díaz *et al.*, 2002) y orexinas (Kojima *et al.*, 2009). Además de estas regiones, el **tálamo** contiene neuronas productoras de NPY (García-Fernández *et al.*, 1992; Peng *et al.*, 1994; Vecino *et al.*, 1994), MCH (Pandolfi *et al.*, 2003; Amano *et al.*, 2003), TRH (Díaz *et al.*, 2002) y orexinas (Kojima *et al.*, 2009). Por último, cabe citar la implicación del **lóbulo vagal** en la regulación de la ingesta como parte del sistema gustativo de los peces y su implicación en las decisiones de palatabilidad, como el rechazo de los

alimentos o la deglución (Morita y Finger, 1985). Además, esta área ha sido particularmente relacionada con la capacidad del carpín para separar el alimento del sustrato, especialmente durante la alimentación del fondo (Morita y Finger, 1985). El lóbulo vagal contiene poblaciones neuronales productoras de NPY (Pickavance *et al.*, 1992) y TRH (Díaz *et al.*, 2002)

En último lugar, cabe citar la implicación de dos sistemas neurales que regulan los fenómenos hedonísticos de recompensa que acompañan al proceso de ingesta. Estos sistemas, caracterizados en mayor medida en mamíferos y muy poco conocidos en peces, incluyen el sistema opioide y el endocannabinoide. Los **péptidos opioides**, entre los cuales destacan la β -endorfina y la dinorfina, regulan tanto procesos de saciedad como de estimulación y mantenimiento de la ingesta, de acuerdo al grado de recompensa orosensorial que originen las características de los alimentos (Gosnell y Levine, 2009; Peciña y Smith, 2010; Olszewski *et al.*, 2011; Bodnar, 2015). Los **cannabinoides** endógenos, como la anandamida y el 2-araquidonilglicerol, ejercen un potente efecto hiperfágico y tienen un papel importante en la regulación de la apetencia por los alimentos, condicionando el pase de la motivación a la acción y ejecución de la ingesta (Cristino *et al.*, 2014; Jager y Witkamp, 2014). Tanto el sistema opioide como el endocannabinoide han sido descritos en peces y relacionados con una posible función en la regulación de la ingesta (Lin *et al.*, 2000; Valenti *et al.*, 2005; Piccinetti *et al.*, 2010; Tinoco *et al.*, 2014a). El circuito de endocannabinoides actúa de manera coordinada con la **dopamina**, neurotransmisor clave implicado en los sistemas de recompensa asociados a la ingesta en los mamíferos (Vucetic y Reyes, 2010; Volkow *et al.*, 2011), y probablemente también en los peces (Leal *et al.*, 2013).

1.2. Señales endocrinas periféricas implicadas en la regulación de la ingesta

El tracto gastrointestinal, el páncreas y el tejido adiposo (y/o el hígado en peces) son los principales órganos periféricos que ejercen un papel importante en la modulación del comportamiento alimentario (Konturek *et al.*, 2004; Chaudhri *et al.*, 2006; Lenard y Berthoud, 2008; Magni *et al.*, 2009; Sam *et al.*, 2012; Holtmann y Talley, 2014; Boguszewski y van der Lely, 2015). Estos órganos secretan numerosos péptidos (**Figura 3**) que ejercen efectos locales controlando el vaciamiento gástrico, la motilidad intestinal, la homeostasis glucémica y la utilización de nutrientes, entre otros, contribuyendo a la regulación de ingesta de alimentos y el metabolismo energético. Además, estos péptidos transmiten señales a los principales centros cerebrales que intervienen en la regulación de la ingesta, regulando la actividad de dichos circuitos y coordinando así la conducta de ingesta con las necesidades del organismo, a corto y largo plazo. Los péptidos periféricos pueden actuar directamente sobre

las neuronas de los centros reguladores del apetito o de manera indirecta activando receptores presentes en fibras aferentes (fundamentalmente del nervio vago). Las aferencias vagales también son activadas por mecanorreceptores y quimiorreceptores localizados en el tracto gastrointestinal que transmiten señales de saciedad al cerebro (Näslund y Hellström, 2007; Sam *et al.*, 2012). Además de modular los circuitos hipotalámicos, en mamíferos se ha demostrado que algunas hormonas gastrointestinales afectan a los mecanismos relacionados con la recompensa y preferencia a los alimentos (Menzies *et al.*, 2013).

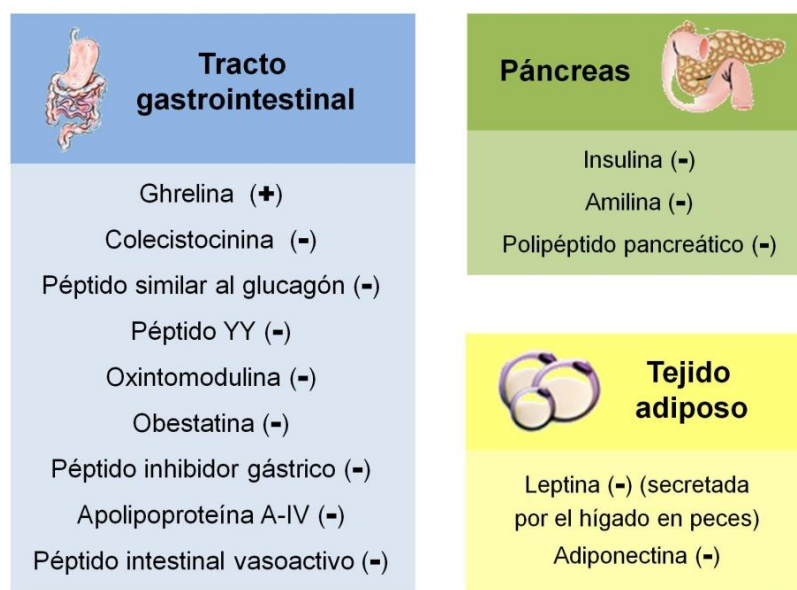


Figura 3. Principales órganos periféricos y péptidos que intervienen en la regulación periférica de la ingesta en los mamíferos y los peces. A la derecha de cada péptido se indica con un signo ‘+’ si tiene carácter orexigénico y con un signo ‘-’ si tiene carácter anorexigénico.

El **tracto gastrointestinal** contiene numerosos tipos diferentes de células enteroendocrinas distribuidas a lo largo del epitelio (Sjölund *et al.*, 1983; Parker *et al.*, 2014) que producen y liberan más de 20 hormonas y moléculas señalizadoras, convirtiéndolo en el mayor órgano endocrino del cuerpo (Chaudhri *et al.*, 2006; Del Prete *et al.*, 2012; Sam *et al.*, 2012; Sobrino Crespo *et al.*, 2014). Una de estas hormonas es la **ghrelina**, que destaca por ser el único péptido gastrointestinal conocido hasta ahora con propiedades potentes orexigénicas. Esta hormona es producida fundamentalmente en el estómago o su equivalente en animales que carecen de él, y posee un importante papel estimulante de la ingesta tanto en mamíferos (Cummings, 2006; De Vriese y Delporte, 2008; Castañeda *et al.*, 2010) como en peces (Kaiya *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011; Jönsson, 2013). En los mamíferos, los niveles de ghrelina muestran cambios periprandiales, con un incremento previo a la hora de la comida habitual, y una reducción post-ingesta para aumentar con otro pico antes de la siguiente comida, lo que sugiere un papel para esta hormona como iniciador de la alimentación (Cummings *et al.*, 2001).

Excepto la ghrelina, el resto de hormonas producidas por el tracto gastrointestinal son de naturaleza anorexigénica. Entre ellas, la CCK, el GLP-1 y PYY son las mejor caracterizadas como inhibidores del apetito, tanto en mamíferos como en peces. La **colecistocinina** es liberada tras la ingesta, normalmente en respuesta a la presencia de grasas saturadas, ácidos grasos de cadena larga, aminoácidos y pequeños péptidos resultantes de la digestión proteica. La CCK, además de ejercer una acción moduladora sobre los circuitos centrales para inhibir el apetito, estimula la liberación de enzimas pancreáticas y de sales biliares como ayuda para la digestión de proteínas y grasas (Volkoff, 2006; Dockray, 2009; 2012). El **péptido similar a glucacón 1** es un producto derivado del glucagón cuya secreción es estimulada fundamentalmente por la presencia de los productos de la digestión de los hidratos de carbono en el intestino. Sus acciones principales consisten en la estimulación de la liberación de la insulina y en la disminución de la secreción ácida gástrica, del vaciado gástrico y de la motilidad intestinal (Volkoff *et al.*, 2005; Shah y Vella, 2014; Steinert *et al.*, 2015). Por último, el **péptido tirosina-tirosina**, en mamíferos, produce el retardo del vaciamiento gástrico y la disminución de las secreciones gástrica y pancreática (Stanley *et al.*, 2004; Wynne y Bloom, 2006). En los peces, se han demostrado importantes acciones inhibitoras del apetito por parte de esta hormona en diversas especies (Gonzalez y Unniappan, 2010; Chen *et al.*, 2015). Además de estos tres péptidos principales, otros péptidos liberados por el tracto gastrointestinal implicados en menor medida en la regulación del apetito de mamíferos y peces son la **oxintomodulina** (Volkoff *et al.*, 2005; Wynne y Bloom, 2006; Wynne *et al.*, 2010), la **obestatina** (Lacquaniti *et al.*, 2011; Gesmundo *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2015), el **péptido inhibidor gástrico o insulíntrópico dependiente de glucosa** (Musson *et al.*, 2011; Ugleholdt, 2011), la **apolipoproteína A-IV** (Tso *et al.*, 2004; Otis *et al.*, 2015) y el **péptido intestinal vasoactivo** (Matsuda *et al.*, 2006a; Vu *et al.*, 2015).

El **páncreas**, concretamente su componente endocrino, secreta importantes péptidos que intervienen en la modulación de la ingesta (Wilson y Enriori, 2015). El más destacable de estos péptidos es la **insulina**, que a nivel del sistema nervioso central, interacciona con receptores ubicados mayoritariamente en las neuronas NPY/AgRP y POMC/CART del ARC, inhibiendo la producción de NPY y estimulando la de POMC, produciendo por tanto una disminución de la ingesta (Silverstein y Plisetskaya, 2000; Xu *et al.*, 2005; Filippi *et al.*, 2013). En los peces, la insulina además estimula la síntesis de glucógeno, la lipogénesis y la síntesis de proteínas (Nelson y Sheridan, 2006). Por otro lado, el páncreas sintetiza y libera **amilina**, que tanto en peces como en mamíferos produce una importante disminución del apetito (Thavanathan y Volkoff, 2006; Hayes *et al.*, 2014; Mietlicki-Baase y Hayes, 2014; Volkoff, 2016). Otro péptido pancreático importante, al menos en mamíferos, es el

polipéptido pancreático, que produce un efecto inhibitor de la ingesta a través de la modulación de las neuronas del ARC y de la actividad vagal (Khandekar *et al.*, 2015). El PPY ha sido también identificado en ciertas especies de peces, pero su función no se conoce de momento con claridad (Volkoff *et al.*, 2005).

El **tejido adiposo** actúa también como un importante órgano con función endocrina (Marcano *et al.*, 2006; Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2011). La principal hormona con función moduladora de la ingesta producida por adipocitos es la **leptina**, aunque también es producida en menor medida en el estómago y la hipófisis. En peces, no es el tejido adiposo el principal productor de leptina sino el **hígado** (Gorissen y Flik, 2014; Londraville *et al.*, 2014). En los mamíferos, esta hormona cruza la barrera hematoencefálica y se une principalmente a receptores específicos en las neuronas del ARC para producir una inhibición de la síntesis y liberación de NPY y AgRP y una estimulación de POMC y CART, ejerciendo un efecto anorexigénico. En los peces, se han realizado numerosos estudios de leptina con resultados discrepantes, si bien en líneas generales parece desempeñar acciones anorexigénicas similares a las de los mamíferos, mediadas por reguladores del apetito hipotalámicos, como el NPY, orexinas y CART (Volkoff *et al.*, 2003). Esta hormona, además, estimula el metabolismo lipídico en la perca y el carpín (Londraville y Duvall, 2002; de Pedro *et al.*, 2006) y modula el metabolismo glucídico del carpín (de Pedro *et al.*, 2006). Como se comentó anteriormente, la leptina, junto con la insulina, participan también en el control lipostático de la ingesta, informando a los centros encefálicos de la magnitud de las reservas grasas del organismo con el fin de que se pongan en marcha mecanismos destinados al control de dichas reservas a través de la regulación de la ingesta a largo plazo (Sahu, 2003; Friedman, 2014; Gorissen y Flik, 2014). Además de leptina, el tejido adiposo de los mamíferos y de los peces expresa **adiponectina**, que interviene en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos (Guerre-Millo, 2008; Sánchez-Gurmaches *et al.*, 2012).

En último lugar, cabe citar a otros dos órganos secundarios capaces de liberar sustancias con funciones reguladoras de la ingesta. Así, el **hígado** produce y libera **adropina**, un péptido que interviene en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos a través de la modulación de la liberación de insulina en mamíferos (Aydin, 2014). Las acciones biológicas de esta hormona en peces no son de momento bien conocidas, aunque recientemente se ha demostrado un papel modulador sobre la expresión de la enzima lipoproteína lipasa en hepatocitos de tilapia (Lian *et al.*, 2016). Por otra parte, el **corazón** sintetiza **irisina**, que en los mamíferos interviene en la regulación del metabolismo del tejido adiposo y la homeostasis de la glucosa (Aydin, 2014). En los peces, un trabajo reciente ha

demostrado que esta hormona inhibe el apetito y estimula la expresión de anorexígenos encefálicos (como *cart*) en el carpín (Butt *et al.*, 2017).

Entre el numeroso y diverso conjunto de péptidos que intervienen en el complejo proceso de regulación de la ingesta y el balance energético, el marco de la presente Tesis Doctoral se centra en el estudio de la **GHRELINA**.

2. GHRELINA

El clonaje del receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento (GHS-R) en 1996 sugería la existencia de un ligando del mismo que estaría implicado en la regulación de la liberación de hormona de crecimiento por parte de la hipófisis. Dicho receptor permaneció huérfano hasta 1999, cuando Kojima y colaboradores identificaron un ligando endógeno al que denominaron *ghrelina*, término derivado de la raíz proto-indo-europea “ghre” que significa crecimiento (Kojima *et al.*, 1999). La ghrelina fue purificada inicialmente en el estómago de rata, y es en este órgano o en la parte más anterior del tracto gastrointestinal donde presenta su máxima concentración, tanto en mamíferos (Kojima *et al.*, 1999; Hosoda *et al.*, 2003; Angeloni *et al.*, 2004; Ghelardoni *et al.*, 2006; Ishida *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2010; Satou *et al.*, 2016), como en aves (Kaiya *et al.*, 2002; Wada *et al.*, 2003; Richards *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2016), reptiles (Kaiya *et al.*, 2004), anfibios (Kaiya *et al.*, 2001; Galas *et al.*, 2002; Kaiya *et al.*, 2006) y peces (Unniappan *et al.*, 2002; Kaiya *et al.*, 2003a; 2003b; 2003c; Sakata *et al.*, 2004; Kaiya *et al.*, 2005; Yeung *et al.*, 2006; Manning *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2008; Teroza *et al.*, 2008; Arcamone *et al.*, 2009; Breves *et al.*, 2009; Miura *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014a; Ji *et al.*, 2015; Volkoff, 2015). En los mamíferos, las células productoras de esta hormona se localizan en las glándulas oxínticas de la mucosa gástrica y se corresponden con células endocrinas de tipo X/A, excepto en humanos que son de tipo P/D1 (Date *et al.*, 2000; Rindi *et al.*, 2002; Arcamone *et al.*, 2009; Mizutani *et al.*, 2009). Si bien el tracto gastrointestinal es la principal fuente de ghrelina, tanto en mamíferos como en peces, una pequeña proporción de la síntesis de este péptido ocurre en el cerebro, fundamentalmente en el hipotálamo (Lu *et al.*, 2002; Unniappan *et al.*, 2002; Kaiya *et al.*, 2003a; Sato *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2006; Ferrini *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2013). Además, en ambos grupos de animales se ha encontrado una baja expresión de ghrelina en otras localizaciones, como la hipófisis (Korbonits *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2013), el corazón (Kaiya *et al.*, 2003a; Beiras-Fernandez *et al.*, 2010), el páncreas (Kageyama *et al.*, 2005; Kaiya *et al.*, 2005), el hígado (Gnanapavan *et al.*, 2002; Zhou *et al.*,

2012; Ji *et al.*, 2015), el riñón (Mori *et al.*, 2000; Kaiya *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2015; Volkoff, 2015), el bazo (Gnanapavan *et al.*, 2002; Unniappan *et al.*, 2002; Volkoff, 2015), el ovario (Caminos *et al.*, 2003; Manning *et al.*, 2008) y el testículo (Tena-Sempere *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2008). En los mamíferos se ha observado expresión de ghrelina también en células gustativas (Shin *et al.*, 2010), pulmones (Volante *et al.*, 2002), placenta (Gualillo *et al.*, 2001) y linfocitos (Hattori *et al.*, 2001), y en el caso de los peces en las branquias (Amole y Unniappan, 2009; Ji *et al.*, 2015), el tejido adiposo (Feng *et al.*, 2013) y el músculo (Feng *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2015).

2.1. Estructura

La ghrelina es una hormona peptídica formada por una única cadena de aminoácidos cuyo número varía dependiendo de las especies (Kojima y Kangawa, 2005). Así, se han encontrado formas de esta hormona con 27-28 aminoácidos en mamíferos (Kojima *et al.*, 1999; Hosoda *et al.*, 2003; Ida *et al.*, 2007), 26-28 en aves (Kaiya *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011), 25 en reptiles (Kaiya *et al.*, 2004), 27-28 en anfibios (Kaiya *et al.*, 2001) y 12-25 en peces (24 en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, Kaiya *et al.*, 2003a; 20 en la tilapia, *Oreochromis mossambicus*, Kaiya *et al.*, 2003b; 21 en la anguila, *Anguilla japonica*, Kaiya *et al.*, 2003c; 22 en el pez gato, *Ictalurus punctatus*, Kaiya *et al.*, 2005; 20 en la dorada negra, *Acanthopagrus schlegeli*, Yeung *et al.*, 2006; 25 en el tiburón martillo, *Sphyrna lewini*, y el tiburón punta negra, *Carcharhinus melanopterus*, Kawakoshi *et al.*, 2007; 19 en el fletán, *Hippoglossus hippoglossus*, Manning *et al.*, 2008; 20 en la lubina, *Dicentrarchus labrax*, Terova *et al.*, 2008; 19 en la carpa china, *Ctenopharyngodon idellus*, Feng *et al.*, 2013). En el carpín, la principal especie objeto de estudio en la presente Tesis, la ghrelina ha sido caracterizada como una hormona con 11 formas moleculares distintas de 14, 17, 18 y 19 aminoácidos (Miura *et al.*, 2009). A pesar del número variable de aminoácidos, la secuencia de ghrelina está bastante bien conservada entre los diferentes grupos de vertebrados, en particular en el extremo NH₂, cuyos primeros cuatro aminoácidos forman el centro activo del péptido (Kojima y Kangawa, 2005; Kaiya *et al.*, 2008) (**Figura 4**).

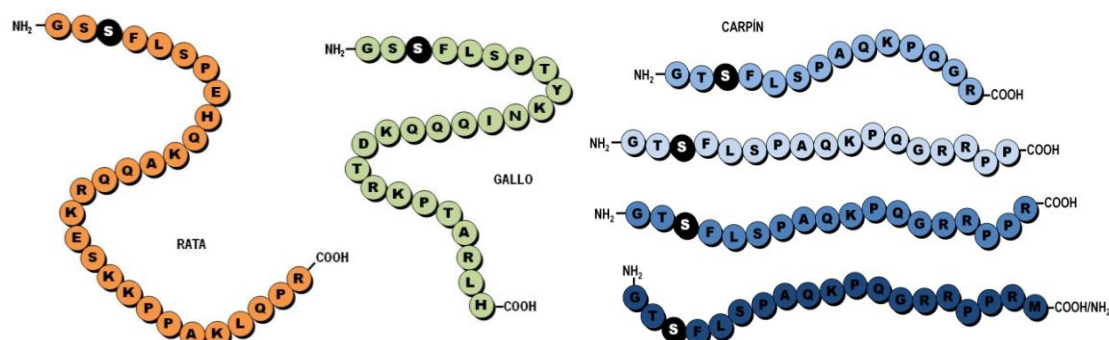


Figura 4. Estructura peptídica de la ghrelina en tres especies ejemplo pertenecientes a grandes grupos de vertebrados: rata (*Rattus norvegicus*, Kojima *et al.*, 1999), gallo (*Gallus gallus*, Kaiya *et al.*, 2002) y carpín (*Carassius auratus*, Miura *et al.*, 2009). Se indica en negro el tercer aminoácido de la cadena, sitio donde tiene lugar la acilación.

Una característica estructural peculiar de esta hormona es que su forma activa requiere la unión de un ácido graso de cadena media a la molécula, tratándose de la única hormona de origen periférico conocida hasta la actualidad con esta modificación (Kaiya *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2016). Dicha acilación consiste generalmente en la unión de un grupo octanoil (C8:0) a la posición 3 de la cadena peptídica, aunque también pueden adicionarse otros tipos de ácidos grasos (véase el apartado 2.3). En todas las especies en las cuales la secuencia de la ghrelina ha sido identificada, el tercer aminoácido de la cadena está ocupado por una serina (**Figura 4**), excepto en el caso de la rana toro (*Lithobates catesbeiana*) en la cual ha sido sustituido por una treonina, que resulta igualmente acilada (Kaiya *et al.*, 2001). Esta acilación es catalizada por la enzima **ghrelina O-aciltransferasa** (GOAT) y es esencial para la unión de la ghrelina al GHS-R (Mohan y Unniappan, 2013; Kojima *et al.*, 2016).

Por último, cabe destacar que en los peces se han encontrado formas de ghrelina que presentan una amidación en el extremo C-terminal, que no está presente en ningún otro grupo de vertebrados (Unniappan y Peter, 2005; Kaiya *et al.*, 2008). Esta amidación tiene lugar gracias a la presencia de la señal de amidación Gly-Arg-Arg al final de dicho extremo, siendo la glicina el aminoácido que contribuye a la creación de la estructura amida (Kaiya *et al.*, 2008). La ghrelina amidada constituye la única forma de ghrelina identificada en algunas especies de peces, como la anguila (Kaiya *et al.*, 2003b) y distintas subespecies de tilapia (Kaiya *et al.*, 2003c, Parhar *et al.*, 2003), mientras que otras especies, como la trucha arco iris (Kaiya *et al.*, 2003a) y el carpín (Unniappan *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2009), presentan tanto ghrelina amidada como no amidada.

2.2. Síntesis, procesamiento, transporte y metabolismo

El gen de la ghrelina, en mamíferos, se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25-26) y está constituido por 5 exones (uno de ellos no codificante) y 4 intrones (Tanaka *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2005). Esta misma organización estructural ha sido identificada en algunas especies de vertebrados no mamíferos, como la trucha arco iris (Kaiya *et al.*, 2003a), el pollo (Nie *et al.*, 2004) y el pavo (Richards *et al.*, 2006), mientras que en el carpín (Unniappan *et al.*, 2002), la tilapia (Parhar *et al.*, 2003) y el besugo negro (Yeung *et al.*, 2006) el gen de la ghrelina parece carecer del primer exón no codificante, presentando por tanto 4 exones y 3

intrones (**Figura 5**). Este gen da lugar a un ARNm que codifica para un precursor peptídico denominado **preproghrelina**, formado por un péptido señal, el péptido maduro de la ghrelina y un péptido C-terminal. La longitud de la preproghrelina varía entre especies, presentando, por ejemplo, 117 aminoácidos en humanos y 103 en el capín (Kaiya *et al.*, 2008; Delporte, 2013) (**Figura 5**).

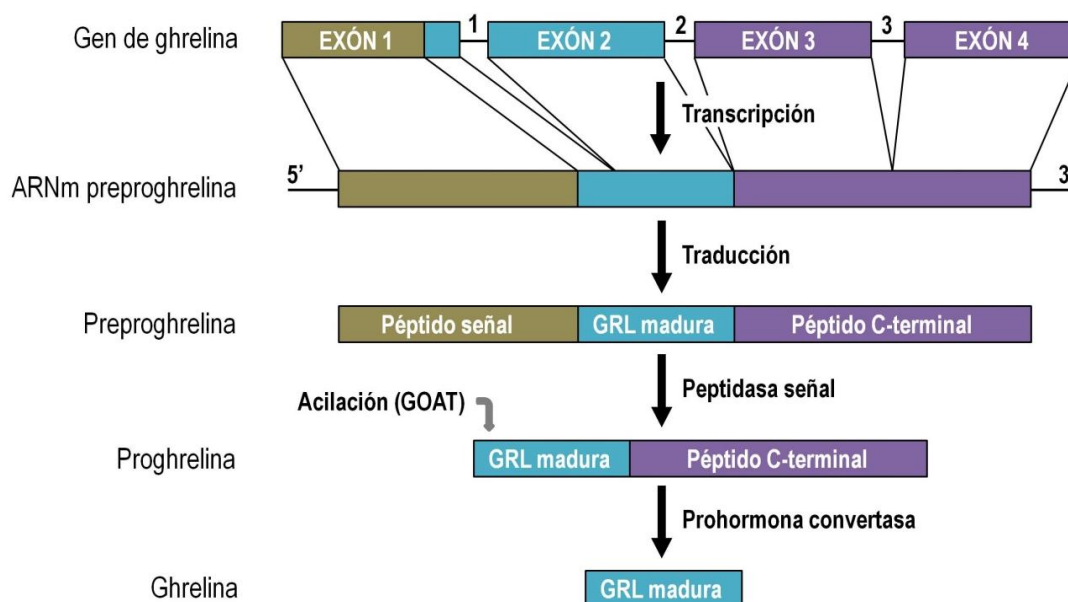


Figura 5. Representación esquemática de la estructura del gen de la ghrelina y de sus precursores preproghrelina y proghrelina en el capín. Modificado de Unniappan y Peter, 2005.

La preproghrelina es rápidamente procesada al finalizar la traducción por una enzima peptidasa señal, que corta y libera el péptido señal dando lugar a la **proghrelina**, la cual contiene únicamente la ghrelina madura y el péptido C-terminal (**Figura 5**). La modificación de la ghrelina por acilación catalizada por la GOAT tiene lugar en este momento del proceso de síntesis, siendo la proghrelina la que se producirá de forma acilada o desacilada en el retículo endoplásmico. No se conoce con certeza de qué depende que se produzca un mayor porcentaje de una forma u otra, pero se ha sugerido que estarían implicados la disponibilidad de ácidos grasos de cadena media en el lumen gástrico o mecanismos de regulación de la actividad de la GOAT (Nass *et al.*, 2015). Una vez en el aparato de Golgi, la forma madura de la ghrelina es liberada de la proghrelina por acción principalmente de la convertasa PC1/3, aunque también la convertasa PC2 y la furina pueden mediar esta liberación (Takahashi *et al.*, 2009). Mientras que la ghrelina se corresponde con la porción N-terminal de la proghrelina, la porción C-terminal da lugar, a través de una serie de proteólisis, a otro péptido funcional denominado **obestatina** (Zhang *et al.*, 2005). El proceso de síntesis y procesamiento postraduccional de la ghrelina se ha revisado en numerosos artículos recientes

(Romero *et al.*, 2010; Mohan y Unniappan, 2013; Gahete *et al.*, 2014, entre otros) y se muestra de manera esquematizada en la **Figura 6**.

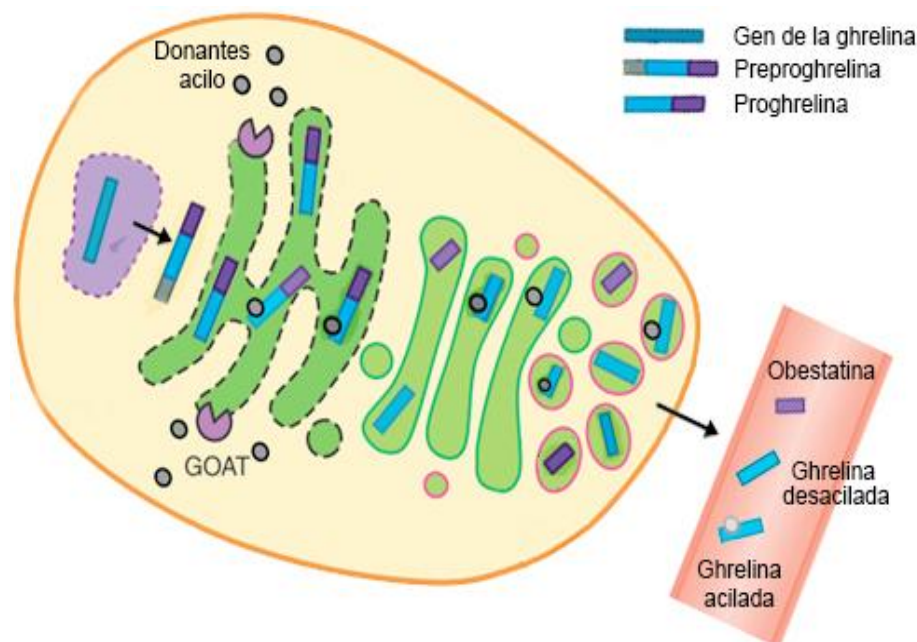


Figura 6. Resumen del proceso de síntesis y procesamiento postraduccional de la ghrelina. En el núcleo, el gen de la ghrelina da lugar a un ARNm con capacidad para codificar el precursor preproghrelina. Tras la traducción de este ARNm, el péptido señal se libera de la preproghrelina, dando lugar a proghrelina que puede ser acilada en el mismo retículo endoplásmico por acción de la ghrelina O-aciltransferasa (GOAT). A continuación, la proghrelina entra al aparato de Golgi, donde convertasas liberan las formas maduras de ghrelina acilada y desacilada que son empaquetadas en vesículas y liberadas al torrente circulatorio por exocitosis. Modificado de Gahete *et al.*, 2014.

Una vez sintetizada, la ghrelina es liberada al torrente circulatorio, donde la mayor parte de la forma acilada se transporta unida a lipoproteínas, mientras que la forma desacilada puede hacerlo de igual manera o en forma libre (Patterson *et al.*, 2005; De Vriese *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2009). Algunas de estas lipoproteínas, como las ricas en triglicéridos y las de baja densidad, interaccionan con la ghrelina a través del grupo acilo, por lo que únicamente son capaces de transportar hormona acilada. Sin embargo, la interacción con lipoproteínas de alta y muy alta densidad tiene lugar a través de los extremos N- y C- terminal, por lo que este tipo de transportadores son capaces de unir también ghrelina desacilada (De Vriese *et al.*, 2007; Holmes *et al.*, 2009). Entre las dos formas de ghrelina, más del 90% de la hormona que viaja en sangre consiste en la forma desacilada, al menos en humanos (Patterson *et al.*, 2005). La ghrelina desacilada presente en la sangre no sólo procede de la fracción de hormona liberada como tal desde las células productoras de ghrelina, sino también de la desacilación de ghrelina acilada en el propio torrente sanguíneo a cargo de esterasas, como la butirilcolinesterasa (De Vriese *et al.*, 2004) o

la proteína acilo tioesterasa 1 (Satou *et al.*, 2011). La vida media de la ghrelina acilada en sangre varía de 30 minutos en rata a 240 minutos en humanos (De Vriese *et al.*, 2004).

Además de los procesos de desacilación, el metabolismo de la ghrelina incluye diferentes actividades catalíticas que conllevan la hidrólisis de la cadena peptídica dando lugar a formas truncadas del péptido. Estas formas truncadas no parecen ser meramente el resultado de la degradación de la ghrelina sino que se ha sugerido que puedan tener una relevancia funcional, si bien de momento es desconocida (Satou *et al.*, 2011; Satou y Sugimoto, 2012). En los mamíferos, se ha propuesto un modelo de degradación de la ghrelina que incluye en primer lugar la desacilación de la hormona (si procede), seguido de la acción de una/s endopeptidasa/s que rompen la cadena entre los aminoácidos 15-16. A continuación, una serie de carboxipeptidasas, aún no identificadas, serían capaces de la generación de formas truncadas más cortas (Satou *et al.*, 2011). Las enzimas involucradas en este modelo de degradación han sido identificadas a nivel plasmático, en el estómago, el hígado y el riñón (De Vriese *et al.*, 2004; Satou *et al.*, 2011). Concretamente, el hígado y el riñón parecen tener un papel especialmente relevante en la degradación de la ghrelina (Yoshimoto *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003).

2.3. Ghrelina O-aciltransferasa

La ghrelina O-aciltransferasa fue descubierta en 2008 por dos grupos de investigadores independientes que identificaron de manera simultánea la enzima responsable de la acilación de la ghrelina (Gutiérrez *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a). Se trata de uno de los miembros de la familia de enzimas O-aciltransferasas unidas a membranas (MBOATs) (Chang y Magee, 2009), concretamente la MBOAT4 (revisado en Al Massadi *et al.*, 2011; Mohan y Unniappan, 2013; Khatib *et al.*, 2015; Kojima *et al.*, 2016). El gen de la GOAT, en las pocas especies descrito, está formado por 3 exones y codifica para una proteína de estructura altamente conservada en la filogenia (Yang *et al.*, 2008a; Hatf *et al.*, 2015; Kojima *et al.*, 2016). Esta proteína está formada por 435 aminoácidos (en la mayoría de los mamíferos), de los cuales destacan la asparagina situada en posición 307 y la histidina en posición 338. Estos dos aminoácidos se conservan en muchas MBOATs y se consideran clave para la funcionalidad de estas enzimas (Gutiérrez *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008a). La GOAT se localiza en la membrana del retículo endoplásmico. En mamíferos se propuso un modelo estructural de la GOAT según el cual la enzima se organizaría en 11 dominios transmembrana y un bucle reentrante (Taylor *et al.*, 2013) (**Figura 7**), no existiendo ninguna otra descripción en otro vertebrado. Si bien el retículo es su localización principal, también se ha detectado la presencia de GOAT en el plasma (Stengel *et al.*, 2010; Goebel-Stengel *et al.*, 2013).

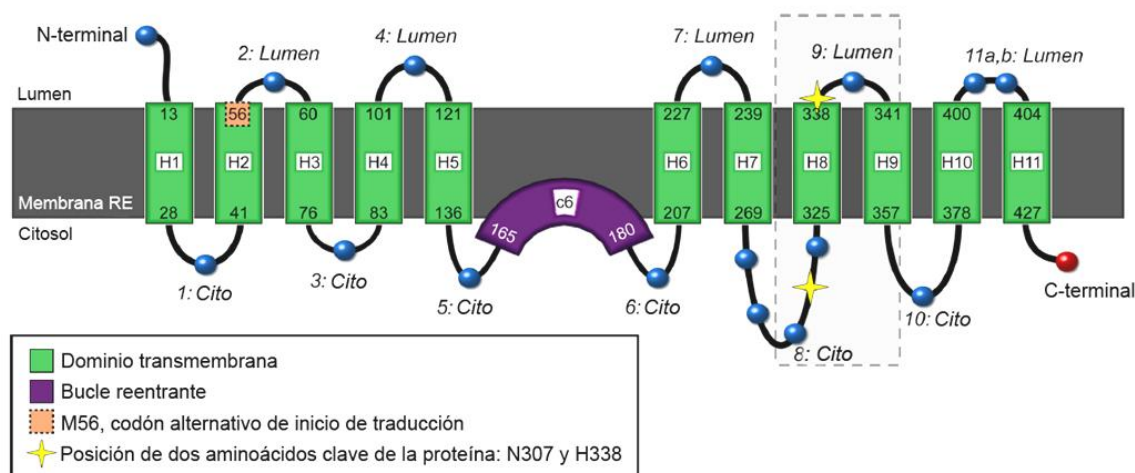


Figura 7. Organización arquitectónica de la GOAT en la membrana del retículo endoplásmico (RE) de mamíferos. Según este modelo, la enzima muestra una topología formada por 11 hélices transmembrana (H1-H11) y un bucle reentrante (c6). Las líneas negras representan los bucles expuestos y su longitud es indicativa del tamaño de cada uno de ellos. Con estrellas amarillas se muestra la posición de dos aminoácidos que se encuentran conservados en muchos de los miembros de MBOATs y que han sido propuestos con importante actividad catalítica; son la asparagina 307 (N307) y la histidina 338 (H338). Modificado de Taylor *et al.*, 2013.

Como se comentó previamente, el proceso de acilación de ghrelina catalizado por la GOAT tiene lugar a nivel de la proghrelina, y no sobre la forma madura de la hormona (revisado en Romero *et al.*, 2010; Mohan y Unniappan, 2013). La proghrelina acilada se obtiene gracias a que la GOAT transloca ácidos grasos unidos a coenzima A (CoA) desde el lado citosólico de la membrana del retículo endoplásmico al lumen para acilar al precursor; en este sentido, la GOAT estaría actuando como un transportador de acil-CoA a través de la membrana del retículo. Si bien la principal forma activa de la ghrelina es modificada por ácido n-octanoico, se ha observado que la GOAT puede catalizar la acilación con diferentes ácidos grasos, como cadenas nonanoil (C9:0), nonenoil (C9:1), decanoil (C10:0), decenoil (C10:1) o decadienoil (C10:2) (Miura *et al.*, 2009; Nishi *et al.*, 2011; Ida, 2012). Parece existir una preferencia de sustrato de la GOAT en función de la especie. Así, en el ratón la enzima utiliza mayoritariamente n-hexanoil-CoA como donador de acilo (Ohgusu *et al.*, 2009), mientras que en humanos prefiere unir una cadena acilo de ocho átomos de carbono (Darling *et al.*, 2015). Por otro lado, el hecho de que péptidos derivados de ghrelina de tan sólo 4 aminoácidos puedan ser modificados por la GOAT (Ohgusu *et al.*, 2009) sugiere que esta enzima pueda estar reconociendo un dominio de esta cantidad de aminoácidos del extremo N-terminal de la proghrelina.

En los mamíferos, la GOAT está presente fundamentalmente en el estómago, el intestino y el testículo de ratón (Yang *et al.*, 2008a), y también existe abundancia en el

páncreas de esta misma especie y de humanos (Gutiérrez *et al.*, 2008; An *et al.*, 2010). En las células del estómago y del duodeno, se ha comprobado que la GOAT se localiza en las células productoras de ghrelina (Sakata *et al.*, 2009; Stengel *et al.*, 2010), si bien se estima que alrededor del 5% de las células que expresan GOAT en la mucosa gástrica de ratón, y alrededor del 45% en rata, no coexpresan ghrelina (Stengel *et al.*, 2010), lo que sugiere la existencia de otro/s sustrato/s endógeno/s para esta enzima, si bien en humanos la ghrelina parece ser el único sustrato de la GOAT (Darling *et al.*, 2015). Diversos estudios han demostrado expresión de esta enzima, aunque en menor cantidad, en el hipotálamo, hipófisis, células gustativas, corazón, pulmón, riñón, bazo, ovario, placenta, tejido adiposo, músculo y condrocitos (González *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2009; Sakata *et al.*, 2009; Gahete *et al.*, 2010; O'Brien *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011; Rucinski *et al.*, 2012). En los peces, apenas se han realizado estudios que aborden la localización de la GOAT, existiendo un único trabajo mostrando altos niveles de expresión de esta enzima en cerebro, intestino y gónadas del pez cebra (Hatef *et al.*, 2015).

2.4. Receptores y mecanismo de acción

El receptor de ghrelina o receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento fue descubierto en 1996 por Howard y colaboradores en el hipotálamo e hipófisis de cerdo y humanos. Se trata de un receptor perteneciente a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G con 7 dominios transmembrana (Howard *et al.*, 1996), que reconoce y une a la hormona en su estado acilado. El receptor de ghrelina pertenece a la misma familia que el receptor de motilina, con el que conserva grandes similitudes (Tine *et al.*, 2016) pues ambos proceden de un mismo receptor ancestral que se duplicó y especializó tras la duplicación génica 1R de los vertebrados. Los mamíferos, junto al resto de tetrápodos, presentan un único gen para GHS-R que codifica para un único tipo de receptor denominado GHS-R1 (Kaiya *et al.*, 2014a; Tine *et al.*, 2016). Sin embargo, los peces teleósteos, como consecuencia de la duplicación genómica 3R (Braasch y Postlethwait, 2012), poseen un gen parálogo al anterior que da lugar a la existencia de dos genes para GHS-R denominados GHS-R1 y GHS-R2 (Kaiya *et al.*, 2013b; Kaiya *et al.*, 2014a; Tine *et al.*, 2016). Dentro de este grupo, los ciprínidos de la Subfamilia *Ciprininae*, como la carpa y el carpín, han experimentado una duplicación genómica adicional (4R; Braasch y Postlethwait, 2012) que ha dado lugar a dos genes parálogos adicionales, contando con un total de cuatro genes diferentes que codifican para receptores de ghrelina: GHS-R1-1, GHS-R1-2, GHS-R2-1 y GHS-R2-2 (Kaiya *et al.*, 2010). Por último, cabe destacar que en algunas especies de teleósteos (como *Oryzias latipes* y *Oreochromis sp.*), el gen GHS-R1 se encuentra modificado presentando el segundo lazo

extracelular considerablemente más largo; este gen se ha denominado GHS-R1-LR. Algunas de estas especies carecen del gen GHS-R2 (Kaiya *et al.*, 2013b; Tine *et al.*, 2016).

Todos los genes del GHS-R tienen una estructura conservada formada por dos exones separados por un intrón, y en ellos se han descrito dos tipos de transcripción alternativa o *splicing* que dan lugar a dos variantes del receptor (McKee *et al.*, 1997; Petersenn *et al.*, 2001). La variante de *splicing* de tipo “a” se corresponde con una transcripción tradicional en la cual se elimina el intrón y se transcriben únicamente los dos exones. Esta variante conserva la estructura completa de los 7 dominios transmembrana y constituye la forma funcional del receptor. La variante de tipo “b” conlleva la transcripción únicamente del exón 1 y una porción del intrón, dando lugar a receptores que poseen sólo los primeros 5 dominios transmembrana y, por tanto, no son funcionales porque han perdido la zona de unión a la proteína G (Kaiya *et al.*, 2013b). Esta forma de receptor estaría implicada en diversas funciones no relacionadas con la señalización por ghrelina, entre las que destaca la reducción de la capacidad de señalización de los receptores de tipo “a” por heterodimerización (Leung *et al.*, 2007; Chow *et al.*, 2012). El fenómeno de *splicing* alternativo de los genes que codifican para los GHS-R ha sido descrito en mamíferos, aves y peces, y de momento sólo ha sido identificado en los genes de tipo 1, aunque dada la gran conservación filogenética de los receptores de ghrelina y motilina es muy probable que también tenga lugar en los genes de tipo 2. En la **Figura 8** se muestra una posible clasificación de los receptores de ghrelina en los distintos grupos de vertebrados.



Figura 8. Subtipos de receptores de ghrelina en los vertebrados. TMD, dominio transmembrana.

Una característica que cabe destacar de los receptores de ghrelina es que suelen encontrarse en las membranas formando dímeros (Holst *et al.*, 2005; Chow *et al.*, 2012). Únicamente los dímeros formados por dos receptores de tipo “a” son activos, ya que como se comentó indicó la presencia de receptores de tipo “b” en los dímeros actúa como un sistema de reducción de la señalización mediada por los receptores funcionales. Se dice, por tanto, que los receptores de tipo “b” son dominantes negativos (Leung *et al.*, 2007), ya que la presencia de uno de ellos en el dímero tiene un efecto negativo sobre el otro componente del

dímero, y que podrían estar interviniendo como una forma de regulación de la sensibilidad de un tejido a la ghrelina. Los receptores GHS-R, no obstante, no sólo forman dímeros entre sí, sino que pueden heterodimerizar con receptores de otros ligandos. En el caso de los GHS-R1a se ha identificado la formación de dímeros con receptores de melanocortinas (Rediger *et al.*, 2009), de hormona liberadora de GH (Casanueva *et al.*, 2008), de dopamina (Jiang *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2012) y de serotonina (Schellekens *et al.*, 2013b). El subtipo GHS-R1b puede encontrarse constituyendo dímeros con el receptor 1 de neurotensina (Takahashi *et al.*, 2006). Estos mecanismos de heterodimerización entre receptores de distintas hormonas podría explicar la interacción entre diferentes sistemas hormonales en la regulación de un mismo proceso (Schellekens *et al.*, 2013a).

El mecanismo de señalización intracelular de los GHS-R se ha estudiado para los receptores de tipo 1a, habiéndose descrito que, dependiendo del tejido y del tipo celular, la activación de estos receptores desencadena diferentes cascadas de señalización intracelular que generarán diferentes respuestas fisiológicas (Yin *et al.*, 2014). Entre ellos, el mecanismo de transducción de señal más clásico utilizado por GHS-R1a conlleva un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, lo cual puede ocurrir a través de la activación de la cascada de señalización dependiente de fosfolipasa C (PLC)/proteína quinasa C (PKC)/inositol trifosfato (IP_3) o de la cascada de la adenilato ciclasa (AC)/adenosín monofosfato cíclico (AMPc)/proteína quinasa A (PKA) (Castañeda *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2014) (**Figura 9**). La vía de señalización de la PLC/PKC/ IP_3 parece mediar el efecto estimulador de la ghrelina sobre la liberación de GH hipofisaria (Chen *et al.*, 1996), mientras que la vía de la AC/AMPc/PKA está implicada en las acciones reguladoras de la ingesta y el balance energético a través de neuronas NPYérgicas del hipotálamo (Kohno *et al.*, 2003). La activación basal de la vía PLC/PKC/ IP_3 también ha sido relacionada con una actividad constitutiva del receptor (Holliday *et al.*, 2007; Damian *et al.*, 2012). En el carpín, tanto la vía de la PLC/PKC/ IP_3 como la vía de la AC/AMPc/PKA han sido recientemente relacionadas con la activación de la expresión de genes reloj en el hígado (Sánchez-Breñaño *et al.*, 2017). Por otro lado, los efectos de la ghrelina sobre la regulación del metabolismo energético en tejidos periféricos parecen estar mediados por la vía de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) (Hardie, 2004). Esta vía está implicada también en la regulación por parte de la ghrelina de la tasa de disparo de las neuronas NPY/AgRP del hipotálamo (Andrews *et al.*, 2008), y en los efectos neuroprotectores frente a la enfermedad de Parkinson en las neuronas dopaminérgicas (Bayliss y Andrews, 2013). Otra vía de transducción que ha sido descrita como mediadora de las acciones de ghrelina y GHS-R1a es la que implica al mecanismo diana de rapamicina en células de mamíferos (mTOR, del inglés *mammalian*

target of rapamycin), vía que modula, por ejemplo, el efecto lipogénico de la ghrelina sobre hepatocitos de ratón (Li *et al.*, 2014). Por último, las vías de la MAP quinasa (MAPK) y de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/serina-treonina quinasa Akt han sido descritas como las vías de señalización empleadas por ghrelina activando GHS-R1a en acciones como la regulación de la gluconeogénesis en humanos (Murata *et al.*, 2002), la estimulación del crecimiento de la corteza adrenal en humanos (Mazzocchi *et al.*, 2004) y la proliferación, diferenciación y apoptosis en adipocitos de ratón (Kim *et al.*, 2004).

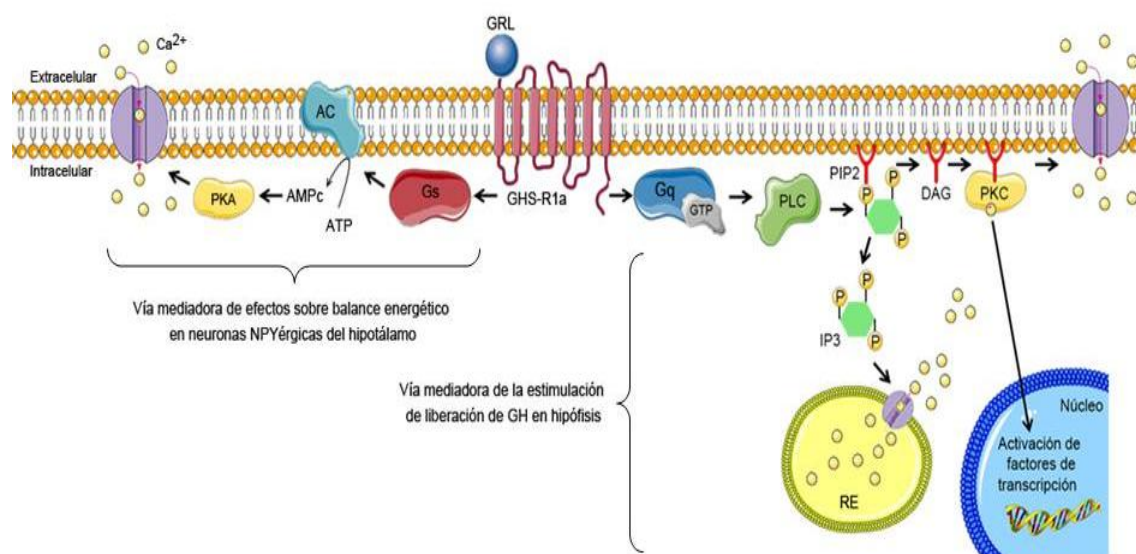


Figura 9. Principales vías de señalización intracelular activadas por la unión de la ghrelina al receptor GHS-R1a: las vías de la PLC/PKC/IP₃ y de la AC/AMPc/PKA (ambas conducen a un aumento de los niveles intracelulares de Ca²⁺). AC, adenilato ciclasa; AMPc, adenosín monofosfato cíclico; ATP, adenosín trifosfato; DAG, diacilglicerol; G_q, subunidad G_q de la proteína G; G_s, subunidad G_s de la proteína G; GRL, ghrelina; IP₃, inositol trifosfato; PIP₂, fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C; RE, retículo endoplásmico. Modificado de Castañeda *et al.*, 2010.

La distribución de los diferentes tipos de receptores de ghrelina atiende a patrones claramente diferentes. Así, tanto en mamíferos como en peces, los GHS-R1a se localizan fundamentalmente en la hipófisis y el hipotálamo, si bien han sido detectados en una gran diversidad de localizaciones, incluyendo otras áreas cerebrales, el corazón, el tiroides, el pulmón, el tracto gastrointestinal, el páncreas, el hígado, el riñón, el testículo y el ovario (Guan *et al.*, 1997; Gnanapavan *et al.*, 2002; Dass *et al.*, 2003; Zigman *et al.*, 2006; Kaiya *et al.*, 2009a; 2009b; Ueberberg *et al.*, 2009; Kaiya *et al.*, 2010; Eom *et al.*, 2014). El GHS-R1b presenta una distribución menos localizada, con los máximos niveles de expresión en la piel, la hipófisis, el corazón, la glándula tiroidea y el páncreas de mamíferos (Gnanapavan *et al.*, 2002), mientras que en los peces ha sido detectado en el cerebro, la hipófisis, las branquias, el tracto gastrointestinal, el hígado, el riñón, el tejido adiposo, el testículo, el ovario y el

músculo (Chan y Cheng, 2004; Chen *et al.*, 2008; Kaiya *et al.*, 2009a; 2009b; Kaiya *et al.*, 2014b). En el caso del receptor GHS-R2, presente únicamente en peces, su distribución parece ser mucho más restringida, pero varía considerablemente dependiendo de las especies. Por ejemplo, en el carpín se restringe a ciertas áreas cerebrales, como el telencéfalo, diencefalo y lóbulo vagal, y a las gónadas (Kaiya *et al.*, 2010), mientras que en el pez cebra muestra sus máximos niveles en la piel y el hígado (Eom *et al.*, 2014). También se ha descrito una elevada expresión de este receptor en los cuerpos de Brockmann del pez gato (Small *et al.*, 2009).

Los GHS-R, al igual que otros receptores acoplados a proteínas G, están sometidos a procesos de desensibilización como consecuencia del desacoplamiento del receptor y la proteína G y su internalización hacia compartimentos intracelulares mediante endocitosis. Este proceso ha sido estudiado para los GHS-R1a y se ha visto que tiene lugar de manera progresiva a partir de 20 minutos tras la estimulación del receptor por la ghrelina (Camiña *et al.*, 2004).

Si bien los GHS-R son los únicos receptores de ghrelina descritos hasta la actualidad, diversas evidencias ponen de manifiesto la existencia de otros tipos de receptores capaces de mediar las acciones de esta hormona (Callaghan y Furness, 2014). Estas evidencias se basan en la capacidad de la ghrelina desacilada para ejercer ciertas funciones biológicas (véase el apartado 2.5), lo cual implica la necesidad de uno o más receptores capaces de reconocer esta forma de ghrelina que no es reconocida por los GHS-R (Gauna *et al.*, 2005; Lear *et al.*, 2010; Delhanty *et al.*, 2012). Callaghan y Furness (2014) sugieren la existencia de dos familias de receptores de ghrelina que aún no han sido identificadas, una de estas familias estaría constituida por receptores capaces de unir únicamente ghrelina desacilada y otra por receptores que reconocen la ghrelina en sus dos estados de acilación. No obstante, se ha descrito que algunas funciones de la ghrelina desacilada están mediadas por receptores de otros ligandos, como sucede en la inhibición de la ingesta inducida por esta hormona en ratas, que ocurre a través del receptor de CRH de tipo 2 (Chen *et al.*, 2005a). En la actualidad, el estudio de los receptores de ghrelina desacilada está muy abierto y constituye un campo que permitiría entender muchos aspectos funcionales de esta forma de hormona y, por tanto, del sistema ghrelinérgico.

2.5. Funciones

La ghrelina se ha implicado en numerosas funciones, entre las cuales las más importantes se reflejan en la **Figura 10**.



Figura 10. Principales acciones biológicas de la ghrelina acilada en los mamíferos. GH, hormona de crecimiento; LH, hormona luteinizante; PRL, prolactina.

La primera acción descrita para esta hormona, dada su condición de secretagogo de la hormona de crecimiento, fue su capacidad de estimular la liberación de GH por la hipófisis. Esta función se observó inicialmente en mamíferos (Kojima *et al.*, 1999; Date *et al.*, 2000; Takaya *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000; Kamegai *et al.*, 2004b; Casanueva y Diéguez, 2005; Carreira *et al.*, 2013), pero hoy se conoce en todos los grandes grupos de vertebrados, incluyendo los peces (Kaiya *et al.*, 2003a; 2003b; 2003c; Chan *et al.*, 2004; Unniappan y Peter, 2004). Cabe destacar que si bien el papel de la ghrelina como estimulador de la GH ha sido clásicamente localizado a nivel hipofisario, se han encontrado evidencias que demuestran que tiene lugar también a nivel hipotalámico, concretamente en neuronas que producen hormona liberadora de GH en el ARC (Popovic *et al.*, 2003; Osterstock *et al.*, 2010). Además, otras hormonas hipofisarias ven modificada su secreción debido a la ghrelina, como es el caso de la prolactina (Riley *et al.*, 2002; Kaiya *et al.*, 2003b; 2003c; Lanfranco *et al.*, 2010; Benso *et al.*, 2013) y la hormona luteinizante (Unniappan y Peter, 2004; Kluge *et al.*, 2007; Sokolowska-Mikolajczyk *et al.*, 2009; Grey *et al.*, 2010; Babaei-Balderlou y Khazali, 2016). Asimismo, se ha demostrado un efecto débil de esta hormona como factor estimulador de la hormona adrenocorticotropa y del cortisol (Takaya *et al.*, 2000; Benso *et al.*, 2013; Kaiya *et al.*, 2013c).

Además del papel regulador de hormonas hipofisarias, la ghrelina ha sido involucrada en una amplia variedad de acciones biológicas tanto en mamíferos (revisadas en Delporte, 2013; Müller, *et al.*, 2015) como en peces (revisadas en Jönsson, 2013; Kaiya *et al.*, 2008; 2013c). Entre ellas, y quizás se trate de su función más destacable, se encuentra su papel como moduladora de la ingesta y el balance energético (Horvath *et al.*, 2001; Inui *et al.*, 2004; Gil-Campos *et al.*, 2006; De Vriese *et al.*, 2010; Jönsson, 2013; Mihalache *et al.*, 2016). En este sentido, al menos en mamíferos, la ghrelina se considera una molécula orexigénica que promueve el inicio de la alimentación (Cummings *et al.*, 2001). Se trata de la hormona periférica más importante con carácter orexigénico, siendo capaz de estimular significativamente el apetito en todos los vertebrados estudiados hasta el momento (mamíferos: Wren *et al.*, 2000; 2001; Asakawa *et al.*, 2003; Tang-Christensen *et al.*, 2004; Keen-Rhinehart y Bartness, 2005; Harrison *et al.*, 2008; anfibios: Shimizu *et al.*, 2014; peces: Unniappan *et al.*, 2002; 2004; Riley *et al.*, 2005; Matsuda *et al.*, 2006b; 2006c; Zhou *et al.*, 2016), exceptuando las aves (Furuse *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2002). En algunas especies, como la trucha arco iris, su efecto sobre la ingesta parece ser contradictorio, con estudios que proponen un carácter orexigénico (Shepherd *et al.*, 2007) y otros un carácter anorexigénico (Jönsson *et al.*, 2010). Estudios en mamíferos han demostrado que la función orexigénica de la ghrelina está mediada principalmente por la activación de las neuronas NPY/AgRP del ARC, ya sea actuando sobre ellas de manera directa o a través de aferencias vagales y el núcleo del tracto solitario (Date *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2010; Kageyama *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014). No obstante, la estimulación del apetito por la ghrelina también implica la activación de otros sistemas cerebrales, como el de las orexinas (Toshinai *et al.*, 2003) y los endocannabinoides (Kola *et al.*, 2008). En peces, concretamente en el carpín, en la acción orexigénica de la ghrelina también parecen estar implicados el NPY (Miura *et al.*, 2006) y las orexinas (Miura *et al.*, 2007). Recientemente se ha sugerido que las acciones orexigénicas de la ghrelina en la trucha arco iris están asociadas a cambios en el metabolismo de ácidos grasos y a la inhibición de los mecanismos sensores de los mismos, lo cual en última instancia modificaría la expresión de péptidos anorexigénicos y orexigénicos resultando en una estimulación del apetito (Velasco *et al.*, 2016a). Además, se ha visto que, al menos en roedores, la ghrelina interviene a nivel central en aspectos más complejos relacionados con la ingesta, como el aprendizaje, la motivación y la ansiedad, actuando sobre el hipocampo, la amígdala y el núcleo dorsal del rafe (Carlini *et al.*, 2004; Álvarez-Crespo *et al.*, 2012; Kanoski *et al.*, 2013; Mason *et al.*, 2014), o en los aspectos hedonísticos que la acompañan, activando centros de recompensa mesolímbicos (Naleid *et al.*, 2005; King *et al.*, 2011; Skibicka *et al.*, 2011; 2012b; Mason *et al.*, 2014). Asimismo, la ghrelina ha sido relacionada en mamíferos con

la palatabilidad y un aumento de la actividad anticipatoria a la ingesta de alimentos apetecibles (Merkestein *et al.*, 2012; Buss *et al.*, 2014).

A nivel periférico, la ghrelina interviene en la regulación de la ingesta a través de efectos sobre la motilidad intestinal. En este sentido, se ha observado que promueve el vaciado intestinal estimulando su contractilidad. Este efecto ha sido descrito en mamíferos (Masuda *et al.*, 2000; Dornonville de la Cour *et al.*, 2004; Peeters, 2005; Fujimiya *et al.*, 2012), aves (Kitazawa *et al.*, 2007; 2009) y algunos peces (como el pez cebra, Olsson *et al.*, 2008), si bien en estos últimos existe cierta controversia respecto a este papel de la ghrelina, ya que un estudio posterior no ha observado este efecto en la motilidad intestinal ni en el carpín ni en la trucha arco iris (Kitazawa *et al.*, 2012). Esta ausencia de efecto ghrelinérgico en la contracción gastrointestinal también parece ocurrir en los anfibios (Kitazawa *et al.*, 2016). Por otra parte, la ghrelina estimula la secreción ácida gástrica en roedores (Masuda *et al.*, 2000; Yakabi *et al.*, 2008; Sakurada *et al.*, 2010), y regula la secreción y actividad de enzimas gástricas en ratas y cerdos (Warzecha *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2016) y pancreáticas en ratas (Kapica *et al.*, 2006; Nawrot-Porabka *et al.*, 2007; Jaworek *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2001).

Otra función importante de la ghrelina recae en su papel regulador del metabolismo de la glucosa (revisado en Yada *et al.*, 2008; Delhanty y van der Lely, 2011; Otto-Buczkowska y Chobot, 2012; Dezaki, 2013; Alamri *et al.*, 2016). Tanto en mamíferos (Broglia *et al.*, 2001) como en algunos peces (como el pez cebra, Schwandt *et al.*, 2010) se ha observado que la ghrelina conduce de forma general a una situación de hiperglucemia. Este efecto es resultado principalmente de una acción inhibidora de la secreción de insulina (Reimer *et al.*, 2003; Dezaki *et al.*, 2004; Cui *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2010) y estimuladora de la secreción de glucagón (Salehi *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2010; Chuang *et al.*, 2011), funciones que podrían tener carácter endocrino o paracrino (Alamri *et al.*, 2016), o estar mediadas por el SNC (Cruz *et al.*, 2010). No obstante, cabe indicar que en los peces el efecto hiperglucemiante de la ghrelina parece ser dependiente de la especie, puesto que la administración sistémica o central de este péptido no altera la glucemia en la trucha arco iris (Polakof *et al.*, 2011). Por otro lado, la ghrelina regula la producción de glucosa vía glucogenolisis y gluconeogénesis en el ratón (Chacko *et al.*, 2012) y estimula su liberación en hepatocitos de tilapia (Schwandt *et al.*, 2010) y cerdo (Gauna *et al.*, 2005). La ghrelina desempeña papeles adicionales en la homeostasis de la glucosa en mamíferos reduciendo la tolerancia a la misma (Tong *et al.*, 2010), modificando la sensibilidad a insulina de tejidos como el hígado y el músculo (Heijboer *et al.*, 2006), y modificando la actividad de neuronas hipotalámicas glucosensoras (Chen *et al.*, 2005b; Wang *et al.*, 2008). En peces, concretamente en la trucha arco iris, se observó que la ghrelina activa importantes marcadores glucosensores (como el transportador

de glucosa de tipo 2 y la glucoquinasa) en el hipotálamo y el cerebro posterior (Polakof *et al.*, 2011). En último lugar, cabe mencionar que estudios en mamíferos han relacionado a la ghrelina con la regulación del transporte de glucosa en ciertos tejidos. Así, en la rata, la ghrelina reduce la captación de glucosa en astrocitos primarios de hipotálamo (Fuente-Martín *et al.*, 2016), incrementa el transporte de este azúcar al interior de adipocitos (Patel *et al.*, 2006; Theander-Carrillo *et al.*, 2006) y aumenta la expresión del transportador de glucosa de tipo 4 en miocitos (Cao *et al.*, 2011). Las posibles acciones de la ghrelina sobre el transporte de glucosa permanecen desconocidas de momento en peces.

Entre sus funciones de regulación de la homeostasis energética, la ghrelina no sólo contribuye al metabolismo de la glucosa sino que también interviene en el metabolismo lipídico. En los mamíferos, la administración central de ghrelina produce un aumento de la adiposidad, como consecuencia de la estimulación de enzimas que promueven el almacenamiento de ácidos grasos y la disminución de la expresión de genes que controlan la oxidación de las grasas en el tejido adiposo blanco (Tschöp *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2004; Theander-Carrillo *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009; Perez-Tilve *et al.*, 2011). Además, la infusión subcutánea e intracerebroventricular crónica de ghrelina aumenta los niveles circulantes de colesterol en ratones, efecto que es consistente con el hecho de que ratones que carecen tanto de ghrelina como de GHS-R1a muestran menores niveles plasmáticos de colesterol que los ratones de tipo salvaje (Perez-Tilve *et al.*, 2010). En peces, apenas existen estudios que investiguen el papel de la ghrelina en el metabolismo lipídico, pero un estudio reciente ha demostrado que esta hormona actúa a nivel central modulando el metabolismo lipídico hepático, incrementando el potencial lipogénico y disminuyendo el potencial oxidativo de ácidos grasos (Velasco *et al.*, 2016b). También se ha observado que la ghrelina aumenta la lipólisis en adipocitos de la trucha arco iris y se ha sugerido que podría estimular la síntesis y movilización de triglicéridos (Salmerón *et al.*, 2015). En el tejido adiposo marrón, se ha demostrado que la ghrelina reduce la termogénesis en roedores (Yasuda *et al.*, 2003; Lin y Sun, 2012) a través de un efecto inhibitorio de la inervación simpática (Yasuda *et al.*, 2003; Mano-Otagiri *et al.*, 2009).

Dejando a un lado el importante papel en la regulación de la ingesta y el balance energético, la gran diversidad de funciones biológicas en las cuales la ghrelina ha sido implicada incluye, en mamíferos, la mejora de funciones cardiovasculares como la vasodilatación y la contractilidad del corazón (Rizzo *et al.*, 2013; Lilleness y Frishman, 2016), funciones en la reproducción (Dupont *et al.*, 2010; Muccioli *et al.*, 2011; Sirotkin *et al.*, 2016), la protección frente a la atrofia muscular (Filigheddu *et al.*, 2007; Porporato *et al.*, 2013), la estimulación de la formación de nuevas neuronas en el hipocampo favoreciendo

procesos de aprendizaje y memoria (Diano *et al.*, 2006; Ferrini *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2013), la estimulación de la proliferación celular e inhibición de la apoptosis en diferentes tipos celulares (Baldanzi *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005; Granata *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008), la regulación del sueño (Weikel *et al.*, 2003; Szentirmai *et al.*, 2006; 2007), la modulación del estrés y la ansiedad (Chuang y Zigman, 2010; Spencer *et al.*, 2012; 2015), la implicación en los mecanismos del dolor actuando como una señal antinociceptiva (Sibilia *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2014b) y un rol neuroprotector en enfermedades degenerativas (Moon *et al.*, 2009; Bayliss *et al.*, 2016), entre otras. En peces, la ghrelina ha sido implicada en la reproducción (Unniappan, 2010; Tena-Sempere, 2013), pero de momento no hay estudios que la relacionen con el resto de funciones.

Todas estas funciones corresponden con acciones biológicas atribuidas a la ghrelina acilada. No obstante, a pesar de haber sido inicialmente considerada como una forma inactiva, durante los últimos años se ha demostrado que la ghrelina desacilada también posee actividad biológica, actuando en muchos casos como un antagonista de la ghrelina acilada (Delhanty *et al.*, 2012). Entre ellas, y en mamíferos, la ghrelina desacilada estimula la liberación de insulina (Gauna *et al.*, 2007), inhibe la liberación de glucosa por los hepatocitos (Gauna *et al.*, 2005), promueve la adipogénesis (Thompson *et al.*, 2004) y la acumulación de lípidos en los adipocitos (Rodríguez *et al.*, 2009), ejerce un efecto cardioprotector sobre las células endoteliales y los cardiomiocitos (Baldanzi *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006), previene la atrofia muscular (Porporato *et al.*, 2013), inhibe la apoptosis celular (Granata *et al.*, 2006) y regula la ansiedad (Stark *et al.*, 2016). En relación con la regulación de la ingesta, las acciones de esta forma desacilada no están muy claras (Inhoff *et al.*, 2009), existiendo estudios que describen una disminución de la misma en ratón (Asakawa *et al.*, 2005) y rata (Chen *et al.*, 2005a), un aumento en rata (Toshinai *et al.*, 2006), o incluso la ausencia de efecto en ratón (Neary *et al.*, 2006) y rata (Inhoff *et al.*, 2008) tras la administración de ghrelina desacilada. Un estudio reciente ha demostrado que la ghrelina desacilada antagoniza el efecto orexigénico causado por la administración periférica de ghrelina acilada en ratones, actuando directamente sobre neuronas del ARC (Fernández *et al.*, 2016). Esta función en particular también ha sido estudiada en peces, concretamente en el carpín, observándose que la ghrelina desacilada no modifica la ingesta por sí sola pero es capaz de bloquear la acción orexigénica de la forma acilada cuando se inyectan conjuntamente (Matsuda *et al.*, 2006b).

2.6. Regulación de su secreción y expresión

La expresión y secreción de ghrelina se encuentran reguladas por diversos factores que,

de manera directa o indirecta, determinan los niveles de ghrelina circulante (Iwakura *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2015). El principal factor regulador de la síntesis de ghrelina y del funcionamiento del sistema ghrelinérgico es la alimentación. En humanos, es bien conocido que los niveles circulantes de ghrelina se elevan preprandialmente y disminuyen a valores basales durante la primera hora después de una comida (Ariyasu *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2001; Frecka y Mattes, 2008), observaciones que han llevado a considerar a la ghrelina como una señal iniciadora de la alimentación. Este perfil de secreción se observa también en otros mamíferos cuando tienen acceso limitado a la comida, pero desaparece cuando tienen libre acceso a la misma (Reynolds *et al.*, 2010), sugiriendo un papel del patrón de alimentación en la regulación periprandial de la ghrelina. Los perfiles periprandiales de secreción de ghrelina también han sido estudiados en peces, pero en ellos no se ha observado un patrón tan claro como el de mamíferos (Unniappan *et al.*, 2004; Peddu *et al.*, 2009). Además, está bien establecido que los niveles circulantes de ghrelina aumentan tras periodos más o menos prolongados de privación de alimento en mamíferos (Toshinai *et al.*, 2001; Ariyasu *et al.*, 2002; Korhonen y Saarela, 2005), mientras que los resultados obtenidos en peces no son tan consistentes (Unniappan *et al.*, 2004; Jönsson *et al.*, 2007; Pankhurst *et al.*, 2008; Fox *et al.*, 2009; Hevrøy *et al.*, 2011). Tanto en mamíferos (Toshinai *et al.*, 2001; González *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008) como en peces (Unniappan *et al.*, 2004; Matsuda *et al.*, 2006c; Terova *et al.*, 2008; Amole y Unniappan, 2009; Feng *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014a), el ayuno no sólo afecta a la liberación de ghrelina al torrente circulatorio, sino también a su expresión génica en diversos tejidos centrales y periféricos, así como a la expresión génica de otros componentes del sistema, como la GOAT (mamíferos: González *et al.*, 2008; Gahete *et al.*, 2010; peces: Hatf *et al.*, 2015) y los GHS-R (mamíferos: Park *et al.*, 2004; peces: Riley *et al.*, 2008; Kaiya *et al.*, 2010; Eom *et al.*, 2014).

Otro factor importante en la regulación del sistema ghrelinérgico son los nutrientes, en particular los macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y lípidos). Numerosos estudios han demostrado que la ingestión de dietas ricas en uno o varios de estos compuestos modifica la secreción y expresión génica de ghrelina, al menos en mamíferos (Beck *et al.*, 2002; Moesgaard *et al.*, 2004; Vallejo-Cremades *et al.*, 2004; Beck y Richy, 2008; Handjieva-Darlenska y Boyadjieva, 2009; Gomez *et al.*, 2012). En peces, muy poco se conoce acerca de este aspecto, existiendo un único estudio en la trucha arco iris que ha descrito que la alimentación con una dieta rica en lípidos conduce a un aumento en los niveles circulantes de ghrelina (Jönsson *et al.*, 2007). La regulación de la secreción de hormonas gastrointestinales por los nutrientes tiene lugar a través de la activación de receptores de nutrientes específicos presentes en la superficie de las células enteroendocrinas (Rasoamanana *et al.*, 2012). Entre

los diferentes nutrientes, la glucosa es el metabolito más estudiado como regulador de la secreción de ghrelina, existiendo una correlación negativa entre la administración (oral o intravenosa) de glucosa y los niveles circulantes de ghrelina en roedores (McCowen *et al.*, 2002) y humanos (Briatore *et al.*, 2003; Broglio *et al.*, 2004a). No obstante, no está claro si se trata de un efecto directo de la glucosa o está mediado por insulina (Iwakura *et al.*, 2015). Los ácidos grasos, fundamentalmente los de cadena larga y corta, también juegan un papel importante suprimiendo la secreción de ghrelina (Feltrin *et al.*, 2006; Gormsen *et al.*, 2006; 2007). Los de cadena media, sin embargo, son utilizados por la GOAT para la acilación de ghrelina (Nishi *et al.*, 2005; Kaiya *et al.*, 2013a), y la ingestión de dietas ricas en ellos produce un aumento en los niveles de ghrelina circulante (Fukumori *et al.*, 2013). Respecto a los aminoácidos, sus efectos sobre la secreción de ghrelina varían según las especies, habiéndose descrito que la infusión intravenosa de aminoácidos esenciales (Overduin *et al.*, 2005) y la perfusión vascular del estómago en cultivo (Shrestha *et al.*, 2009) suprimen los niveles de ghrelina en ratas (Overduin *et al.*, 2005; Shrestha *et al.*, 2009), mientras que la administración oral conduce a un incremento en humanos (Knerr *et al.*, 2003).

Por otro lado, en los mamíferos se ha descrito que la síntesis y secreción de ghrelina se encuentran bajo un importante control hormonal (Iwakura *et al.*, 2015; Alamri *et al.*, 2016). Una de las principales hormonas en este sentido es la insulina, cuya administración conlleva una importante reducción de los niveles circulantes de ghrelina en ratas (Kamegai *et al.*, 2004a) y humanos (Broglio *et al.*, 2004a). El uso de técnicas de cultivo primario de células estomacales de roedores permitió determinar que la insulina es capaz de actuar directamente sobre células ghrelinérgicas para inhibir la secreción de ghrelina (Gagnon y Anini, 2012). La insulina, además, es capaz de inhibir la acción orexigénica de la ghrelina actuando a través de receptores específicos de insulina localizados en las neuronas NPY/AgRP del ARC de ratas (Maejima *et al.*, 2011). Este mismo efecto es ejercido al mismo nivel por la leptina (Kohno *et al.*, 2007), cuya aplicación a cultivos estomacales de rata está relacionada con la supresión de la secreción de ghrelina (Kamegai *et al.*, 2004a; Lippl *et al.*, 2005). Junto a la insulina y la leptina, otros péptidos periféricos que ejercen un efecto inhibitorio sobre la secreción de ghrelina en humanos son los péptidos análogos a glucagón (Banasch *et al.*, 2006; Hagemann *et al.*, 2007) y el PYY (Batterham *et al.*, 2003), entre otros. Por el contrario, las hormonas sexuales, como los estrógenos (Kellokoski *et al.*, 2005) y los andrógenos (Pagotto *et al.*, 2003), producen un incremento en los niveles circulantes de ghrelina en humanos. A nivel central, la hormona más importante relacionada con la secreción de ghrelina es la GH, cuya aplicación a cultivos estomacales de rata disminuye la secreción de la primera (Seoane *et al.*, 2007). Por último, la oxitocina y la vasopresina estimulan la liberación de esta hormona en

células estomacales de ratón (Iwakura *et al.*, 2011). La regulación endocrina que subyace a la liberación de ghrelina en los peces permanece muy poco conocida a día de hoy.

Por último, se ha propuesto un control neural autónomo de la secreción de ghrelina en los mamíferos (Hosoda y Kangawa, 2008), mediado por terminaciones simpáticas a nivel gástrico (Mundinger *et al.*, 2006) que estimulan la secreción de la hormona. Aunque se ha sugerido un control vagal colinérgico de la secreción de ghrelina en rata y humanos (Broglia *et al.*, 2004b; Shrestha *et al.*, 2009), no parece tratarse de un control directo (Iwakura *et al.*, 2015). De nuevo, desconocemos esta posible regulación neural de la síntesis de ghrelina en los peces.

3. ESPECIES DE ESTUDIO

3.1. Carpín (*Carassius auratus*)

El carpín o carpa dorada, *Carassius auratus*, es un teleósteo de agua dulce perteneciente al orden Cipriniforme, Familia Cyprinidae (**Fotografía 1**). Es una especie originaria de China que fue introducida en Occidente alrededor del siglo XVII. Durante siglos, el carpín ha sido domesticado y criado en cautividad, y cruces selectivos a lo largo del tiempo han dado lugar al desarrollo de más de 300 variedades de la especie, con diferentes formas, hábitats y modos de vida. En la actualidad, la mayoría de las variedades son criadas fundamentalmente como peces ornamentales. En la presente Tesis Doctoral se han empleado ejemplares de las variedades común y cometa.



Fotografía 1. Ejemplar adulto de carpín (*Carassius auratus*) variedad común.

Morfológicamente, el carpín presenta el cuerpo corto y compacto, de coloración amarillenta o anaranjada con reflejos blanco-plateados por los flancos y la superficie ventral (**Figura 11**). Los adultos suelen medir entre 10 y 20 cm, aunque pueden llegar a alcanzar una longitud de hasta 45 cm. Presenta cinco juegos de aletas, siguiendo el patrón típico de la

mayoría de los miembros de la familia *Cyprinidae*: una aleta dorsal de base amplia y con espinas óseas, un par de aletas pectorales y otro de aletas pélvicas cortas y anchas, una aleta anal y una gran aleta caudal al final de un pedúnculo ancho y corto. Sus escamas son de gran tamaño y uniformes tanto en forma como en tamaño (Blanco *et al.*, 2017d). Carece de barbillones en el maxilar superior, característica que lo diferencia de otras carpas, y posee huesos faríngeos inferiores llamados dientes faríngeos que utiliza para triturar el alimento.



Figura 11. Esquema de la anatomía externa del carpín. Modificado de Blanco *et al.*, 2017d.

La anatomía interna de este teleosteo se muestra en la **Figura 12**. Una característica notable es que presenta un sistema digestivo carente de estómago. En su lugar, la transición del esófago al intestino viene marcada por una constricción circular, el esfínter intestinal, seguido de un ensanchamiento del intestino denominado bulbo intestinal. Esta región se distingue del intestino propiamente dicho por su mayor anchura y por el mayor grosor de sus capas musculares, lo que le otorga una gran capacidad de expansión (McVay y Kaan, 1940; Sarbahi, 1951). Además, cabe destacar la anatomía difusa del hígado, formado por estrechos lóbulos hepáticos que se extienden alrededor del bulbo intestinal y el intestino. Embebido en el parénquima del hígado se encuentra el rudimentario páncreas en forma de células dispersas (Sarbahi, 1951). En esta Tesis, nos referiremos a esta organización estructural que engloba el hígado y el páncreas con el término de hígado para facilitar la lectura.

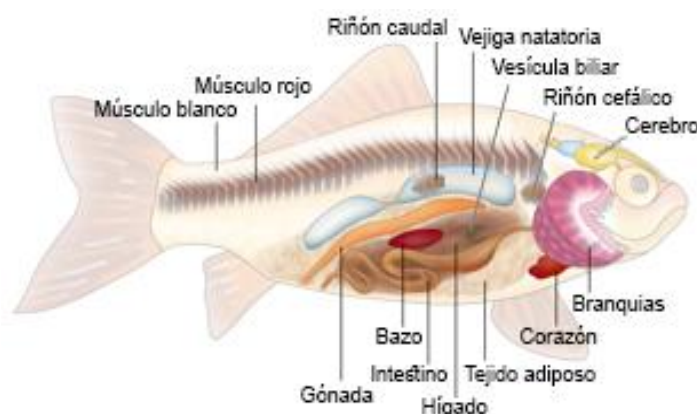


Figura 12. Esquema de la anatomía interna y principales órganos del carpín. Modificado de Blanco *et al.*, 2017d.

El carpín habita en aguas poco profundas de lagunas y ríos de corriente lenta, con fondos blandos ricos en vegetación. Prefiere aguas templadas o frías (10-21°C) de pH próximos a la neutralidad (7-7,5) (Kottelat y Freyhof, 2007), aunque soporta condiciones más extremas, como las temperaturas elevadas, escasez de oxígeno disuelto e incluso ciertos tipos de contaminación acuática (Muus y Dahlström, 1981). Durante el invierno permanece casi completamente enterrado en el barro, limitando su actividad hasta la llegada de la primavera. De comportamiento tranquilo, en la naturaleza y en estanques suele vivir formando cardúmenes, a veces combinados con otras especies.

En cuanto a la alimentación, es una especie omnívora y bentónica que se caracteriza por nadar de forma constante buscando y persiguiendo su comida. En su hábitat natural se alimenta fundamentalmente de organismos planctónicos, pequeños crustáceos, moluscos, gusanos, larvas de insectos y plantas acuáticas que se encuentran en el barro del fondo (Muus y Dahlström, 1981). En condiciones de laboratorio, selecciona principalmente para su dieta carbohidratos, seguidos de grasas y proteínas (Sánchez-Vázquez *et al.*, 1998). Si bien es una especie de crecimiento por lo general rápido, éste viene determinado en gran medida por la cantidad de alimento que pueda obtener de su hábitat.

El carpín alcanza la madurez sexual a partir de los 8-10 meses. La reproducción se produce entre los meses de mayo y junio, en aguas con densa vegetación, si bien este periodo puede variar en función de la temperatura del agua. Dependiendo de su tamaño, la hembra puede llegar a poner entre 200.000 y 400.000 huevos, que deposita adheridos a las plantas acuáticas de la orilla y que tardarán entre 3 y 8 días en eclosionar, dependiendo de la temperatura del agua.

La facilidad de manejo, su tamaño y fácil adaptación a una gran variedad de ambientes (incluidas condiciones de laboratorio), entre otras importantes características favorables, han convertido al carpín en una especie ampliamente utilizada en investigación (Blanco *et al.*, 2017d). El uso de esta especie en trabajos científicos se remonta a 1901, cuando William L. Underwood describió el rol del carpín como devorador de las larvas de mosquito (Underwood, 1901). Desde entonces, el empleo de esta especie en la investigación ha ido aumentando considerablemente a lo largo de los años (Blanco *et al.*, 2017d). En la última década, nuestro grupo de investigación se ha especializado en el estudio de la fisiología de este teleósteo, centrándose fundamentalmente en estudios sobre ingesta (Vivas *et al.*, 2011; Tinoco *et al.*, 2012; 2014b; 2015), estrés (Azpeleta, 2013) y sistema circadiano (Feliciano *et al.*, 2011; Nisembaum *et al.*, 2012; 2014a; 2014b; Sánchez-Breñaño *et al.*, 2015a; 2015b; 2016; 2017).

3.2. Pez cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra o danio cebra, *Danio rerio*, es un teleósteo dulceacuícola perteneciente al orden Cipriniforme, Familia *Ciprinidae* (Wixon, 2000) (**Fotografía 2**). Se trata de una especie originaria de los ríos del sureste asiático, cuyo área de distribución natural incluye las cuencas del Ganges y el Brahmaputra y las aguas dulces tropicales de las regiones monzónicas de la India, Bangladesh, Nepal, Pakistán, Bután, Tailandia y el norte de Myanmar. Actualmente, existen alrededor de 30 líneas de peces cebra salvajes (*Zebrafish Model Organism Database*, ZFIN), entre las cuales la línea *Tuebingen* o *Tübingen* ha sido elegida para realizar los trabajos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral. A día de hoy, el pez cebra es una especie con gran importancia en acuariofilia y como modelo de estudio en investigación básica y aplicada (Spence *et al.*, 2008).



Fotografía 2. Ejemplares adultos (hembra y macho) de pez cebra (*Danio rerio*) variedad *Tuebingen*.

Su morfología se caracteriza por presentar el cuerpo alargado, fusiforme, con 5 a 9 bandas longitudinales de color azul oscuro, dándole un aspecto cebrado del que toma su nombre. Los adultos raramente alcanzan una longitud superior a los 4 cm. Posee una única aleta dorsal con el borde superior de color azul bordeado de blanco y una aleta caudal con el mismo patrón de bandas que el resto del cuerpo. La boca se encuentra dirigida hacia arriba y posee un par de finas barbillas. Presenta dimorfismo sexual tanto en el tamaño como en el color: la hembra suele ser más grande, de un color de fondo plateado y con el vientre más blanquecino y redondeado, mientras que el macho es más pequeño, alargado y adquiere tonalidades más doradas (Schilling, 2002). La anatomía interna del pez cebra es semejante a la del carpín y, al igual que éste, pertenece al grupo de peces carente de estómago en los cuales el esófago conecta directamente con el intestino (Wang *et al.*, 2010).

El pez cebra habita fundamentalmente en pequeñas y tranquilas masas de agua con abundante vegetación, a menudo adyacentes a campos de arroz (Jayaram, 1999). Esta asociación con los cultivos de arroz puede estar relacionada con el uso de fertilizantes que promueven el crecimiento de zooplancton, un componente importante de su dieta, o con la

ausencia en ellos de grandes depredadores (Spence *et al.*, 2007). Su temperatura óptima es entre 20 y 30°C, aunque puede soportar temperaturas de hasta 10°C, y prefiere aguas neutras o ligeramente básicas (pH 7-8) de dureza media. Es un pez muy activo y veloz cuyo comportamiento se caracteriza por ser sociable y poco agresivo. Generalmente se encuentra formando grupos de mínimo seis ejemplares que nadan al unísono (Spence *et al.*, 2008).

Se trata de una especie omnívora que obtiene su alimento de la columna de agua, ingiriendo principalmente fitoplancton, zooplancton, larvas de insectos y pequeños crustáceos, aunque si estas fuentes de alimentación no están disponibles también puede alimentarse de pequeños insectos y arácnidos presentes en la superficie del agua (Spence *et al.*, 2007; 2008).

Como ocurre con otros peces de regiones monzónicas, la época de lluvias marca en general el inicio de la estación de reproducción del pez cebra en estado natural, que suele tener lugar de abril a agosto, si bien en condiciones de laboratorio es capaz de reproducirse durante todo el año (Spence *et al.*, 2008). Alcanza la maduración sexual a los 3-4 meses y la reproducción tiene lugar en zonas con fondo de sedimento y abundante vegetación. Una hembra es capaz de reproducirse a intervalos de dos a tres días, liberando cientos de huevos en cada puesta. Los huevos son demersales, no adhesivos, con un diámetro aproximado de 0,7 mm y suelen eclosionar a las 48-72 h a 28,5°C (Kimmel *et al.*, 1995).

Desde los trabajos pioneros de George Streisinger y colaboradores en 1981 (Streisinger *et al.*, 1981), que emplearon a esta especie para aplicar técnicas de genética molecular al estudio de la embriología de vertebrados, el pez cebra se ha convertido en un organismo muy popular en investigación (Westerfield, 2000; Löhr y Hammerschmidt, 2011; Lin *et al.*, 2016). Una serie de características lo sitúan como un modelo de estudio idóneo: 1. Es de tamaño pequeño y muy fácil de criar, siendo muy accesible su mantenimiento en condiciones de laboratorio (Spence *et al.*, 2008); 2. Su crecimiento es rápido y una hembra es capaz de desovar cada 2 -3 días, lo que facilita la realización de estudios de desarrollo (Spence *et al.*, 2008); 3. Sus huevos son de gran tamaño en relación a otros peces y ópticamente transparentes, facilitando su manipulación y monitorización durante el desarrollo, siendo ideales para técnicas de imagen *in vivo* (Kimmel *et al.*, 1995). 4. Posee un genoma diploide secuenciado en su totalidad, lo que los hace adecuados para estudios genéticos (Howe *et al.*, 2013); 5. Fue sujeto de los primeros barridos o *screens* mutagénicos realizados en vertebrados (Driever *et al.*, 1996; Haffter *et al.*, 1996), con más de 4.000 mutaciones que constituyen una valiosa herramienta para el análisis funcional de genes en un futuro cercano.



OBJETIVOS

Los mecanismos que regulan la ingesta en los peces han sido estudiados desde hace décadas, durante las cuales una gran variedad de péptidos han sido identificados e implicados en diversos aspectos relacionados con la regulación del apetito. Entre estos péptidos, se encuentra la ghrelina, sintetizada principalmente en el estómago o su equivalente en especies que carecen de él. El conocimiento acerca de la funcionalidad de la ghrelina ha ido aumentando en los últimos años, pero hay muchos aspectos acerca de su funcionalidad y mecanismos de acción que permanecen desconocidos, fundamentalmente en los peces. Por ello, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es ampliar y profundizar en los conocimientos del sistema ghrelinérgico en los peces y, en particular, en sus implicaciones funcionales en relación con la alimentación, utilizando dos especies modelo de teleósteos, el carpín y el pez cebra. Una de las aplicaciones más importantes de estas investigaciones es mejorar las estrategias de alimentación de los peces, lo cual entre otras cosas tiene una implicación en uno de los principales retos de la acuicultura actual: la sostenibilidad del proceso productivo. Para abordar este objetivo general, se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

► **Objetivo 1:** Caracterización de la enzima ghrelina O-aciltransferasa del carpín.

Para que la ghrelina desarrolle la mayor parte de su actividad biológica se requiere una acilación postraducciona del péptido, lo que le capacita para su unión y activación de los receptores. Por tanto, en primer lugar, se pretende identificar la secuencia génica, estructura y topología de la enzima encargada de dicha acilación, la GOAT, en el carpín, para a continuación analizar su patrón de expresión en tejidos centrales y periféricos y la distribución anatómica de la proteína en las distintas regiones encefálicas y a nivel intestinal. A fin de determinar la posible relevancia de la alimentación en esta enzima,

pretendemos investigar las posibles variaciones diarias de su expresión en localizaciones centrales y periféricas, determinando el papel del horario de alimentación.

- ▶ **Objetivo 2:** Estudio de los efectos de la alimentación sobre el sistema ghrelinérgico del carpín.

Conociendo la importante relación entre el sistema ghrelinérgico y la ingestión de alimento, y la relevancia de la alimentación como regulador de dicho sistema en los mamíferos, con este objetivo se pretende caracterizar la posible modulación ejercida por la alimentación en el sistema ghrelinérgico del carpín, utilizando distintas aproximaciones experimentales que nos permitan conocer si existen variaciones periprandiales del sistema, su respuesta ante periodos de ayuno y la modulación por los distintos macronutrientes de la dieta.

- ▶ **Objetivo 3:** Caracterización de los efectos de la ghrelina sobre la regulación del apetito y la fisiología digestiva del carpín.

Una de las funciones principales de la ghrelina es su papel orexigénico, estimulando la ingesta en la mayoría de las especies estudiadas. En este capítulo se pretende profundizar en los mecanismos subyacentes a esta acción orexigénica de la ghrelina en el carpín, investigando la posible participación de factores anorexigénicos intestinales, en concreto la CCK, PYY y GLP-1. Asimismo, en busca de nuevas funcionalidades para esta hormona, se estudiará la posible intervención del sistema ghrelinérgico en procesos posteriores a la ingesta y, en concreto, en la modulación de la expresión de enzimas digestivas y en los mecanismos de absorción intestinal de glucosa.

- ▶ **Objetivo 4:** Desarrollo de una línea transgénica de pez cebra carente de *preproghrelina*.

Como una herramienta adicional para comprender las implicaciones funcionales del sistema ghrelinérgico en los teleósteos, se persigue generar una línea de pez cebra deficiente de ghrelina. En esta línea se pretende analizar y comparar la expresión de reguladores del apetito centrales y periféricos, enzimas digestivas y transportadores de glucosa, como una aproximación adicional y complementaria al estudio del sistema ghrelinérgico en peces.



The background of the entire page is a watercolor-style illustration of several goldfish swimming in blue water. The fish are depicted in various shades of orange and yellow, with some showing white spots. The water is painted with various shades of blue, creating a sense of depth and movement. The overall style is artistic and somewhat abstract.

CAPÍTULO 1

Identificación y caracterización de la ghrelina O-aciltransferasa del carpín

CAPÍTULO 1

RESUMEN

La ghrelina O-aciltransferasa es un elemento clave en el funcionamiento del sistema ghrelinérgico al ser la enzima encargada de catalizar la acilación postraducciona de la ghrelina, modificación esencial para la unión de la misma al receptor GHS-R1a (principal receptor) y, por tanto, para ejercer la mayoría de sus funciones biológicas. Desde su identificación en 2008, la GOAT ha sido descrita en algunos mamíferos pero, en los peces, su secuencia génica ha sido clonada únicamente en el pez cebra, mostrando en torno al 60% de similitud respecto a la GOAT de mamíferos. En este contexto, la primera parte de este capítulo se ha centrado en la identificación de la secuencia génica de la *goat* del carpín mediante el empleo de las técnicas de PCR convencional y PCR con amplificación rápida de los extremos 5' y 3' del ADNc (RACE-PCR) (véase detalle de la metodología en el Anexo metodológico II). Encontramos que en los tejidos analizados se expresan dos transcritos de ARNm con alto grado de homología (de 1491 y 1413 pb, respectivamente) que denominamos *goat-V1* y *goat-V2*. La estructura del gen de *goat* se encuentra conservada a lo largo de la filogenia y, en la mayoría de los vertebrados, consta de tres exones y dos intrones. Sin embargo, en la presente Tesis, tras comparar las secuencias obtenidas a partir de PCRs usando ADN genómico con las secuencias obtenidas a partir de ADNc, hemos demostrado que el gen de *goat* del carpín, así como el de al menos otras tres especies de ciprínidos analizadas *in silico* (carpa común *Cyprinus carpio*, barbo asiático *Sinocyclocheilus sp.* y pez cebra), contiene cuatro exones y tres intrones. De los dos primeros exones (que llamamos exón 1' y exón 1), únicamente se transcribe uno de ellos. En la mayoría de vertebrados, es el exón 1 el que se transcribe dando lugar al transcrito 1-2-3. No obstante, en nuestro estudio hemos encontrado que en el carpín se transcribe el exón 1', generando el transcrito 1'-2-3.

Además, entre las dos formas de *goat* identificadas, *goat-V1* resultaría de la transcripción total de los exones 1'-2-3, mientras que *goat-V2* es generada por *splicing* 3' alternativo en el exón 2, de manera que le faltan los primeros 78 pares de bases de dicho exón (**Figura 14**).

Las dos variantes de *splicing* de *goat* identificadas podrían codificar para proteínas de 393 y 367 aminoácidos, respectivamente. Sin embargo, el hecho de que el primer exón del gen de *goat* sea diferente al del resto de los vertebrados estudiados, y por tanto también lo sea el inicio de las proteínas por él codificadas, nos ha planteado la pregunta de si las secuencias génicas identificadas son capaces de codificar para proteínas funcionales. A fin de responder a dicha pregunta, hemos procedido a la transfección de distintas líneas celulares (HeLa, HEK-293, COS-7 y Sf-9) con el material genético identificado en carpín con objeto de determinar si dicho material genético era capaz de expresarse y traducirse en una proteína. Nuestros primeros resultados han demostrado que las líneas celulares empleadas son capaces de expresar el gen de *goat* de carpín, como demuestra la visualización (y posterior secuenciación) de una banda específica tras aplicar las técnicas de PCR y electroforesis (**Figura 13**). No obstante, los resultados preliminares de los que a día de hoy disponemos no nos han permitido la identificación de la proteína GOAT, si bien esto no descarta que las proteínas de carpín sean funcionales ya que podría estar existiendo una incompatibilidad en el uso de codones entre las diferentes especies (carpín *vs.* especie de la línea celular utilizada) que se encuentre bloqueando la etapa de traducción. Estos resultados sugieren que probablemente sólo el uso de líneas celulares de peces, y particularmente de líneas celulares de carpín, permita comprobar la funcionalidad de esta enzima. Nuestras líneas de trabajo actuales y para un futuro próximo tienen como uno de sus principales objetivos trabajar con estas líneas celulares de peces para corroborar este aspecto.

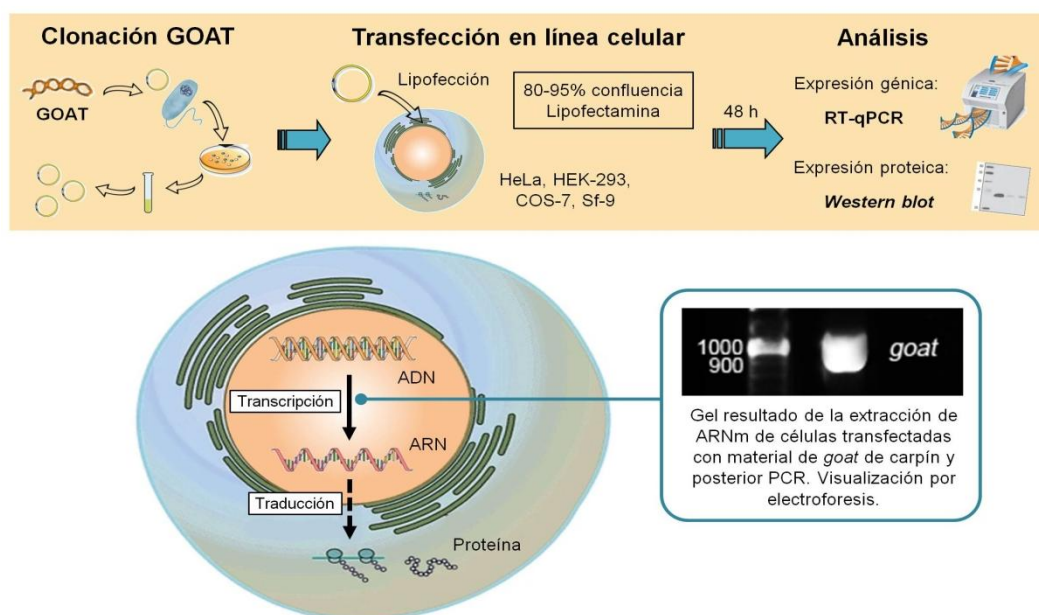


Figura 13. Diseño experimental y resultados preliminares obtenidos en los experimentos de transfección de líneas celulares primarias con material genético de *goat* de carpín. La parte superior muestra el diseño experimental y la parte inferior los resultados esquematizados.

Mediante un análisis filogenético, se observó que las secuencias nucleotídicas de GOAT de carpín muestran un alto grado de conservación con otros vertebrados, especialmente en las zonas correspondientes al segundo y tercer intrón, y una elevada identidad con las secuencias de carpa común, pez cebra y pez de las cuevas (*Astyanax mexicanus*). La secuencia aminoacídica de las proteínas potencialmente codificadas por las dos variantes también muestran una alta homología con la del resto de vertebrados. Además, empleando herramientas bioinformáticas (véase el Anexo metodológico II), observamos que tanto GOAT-V1 como GOAT-V2 son proteínas integrales de membrana, con 11 y 9 dominios transmembrana, respectivamente. Los dos residuos aminoacídicos considerados importantes para la funcionalidad de la GOAT, asparagina-307 e histidina-338 (posiciones en base a la secuencia de la proteína humana) están conservados en la GOAT-V1 y GOAT-V2 del carpín. En ambas variantes, la asparagina se encuentra localizada en un bucle citosólico formado por aminoácidos hidrofílicos, mientras que la histidina se localiza en un dominio transmembrana muy próxima a la cara luminal (**Figura 14**). Por tanto, la topología de las dos variantes de GOAT del carpín es similar a la descrita para la GOAT de los mamíferos y para otras MBOATs.

El siguiente paso en la caracterización de GOAT en el carpín consistió en el estudio del patrón tisular de expresión de las dos variantes génicas identificadas mediante la técnica de RT-qPCR (más detalles en el Anexo metodológico II). Para ello, se tomaron muestras de cerebro y tejidos periféricos de cuatro ejemplares de carpín mantenidos en fotoperiodo de 12 h luz:12 h oscuridad (12L:12D; encendido de las luces a las 8:00) y alimentados diariamente a las 10:00. Los resultados obtenidos muestran que las dos variantes presentan un patrón de expresión tisular muy similar, con los niveles de expresión más elevados detectados en las gónadas y el tracto gastrointestinal (incluidos el esófago, bulbo intestinal, intestino anterior e intestino medio). Niveles menores, pero significativos, de expresión de *goat* se encontraron en el encéfalo, hipófisis, intestino posterior, hígado, riñón y tejido adiposo (**Figura 14**). El uso de técnicas inmunohistoquímicas (más detalles en el Anexo metodológico IV) confirmó la expresión de GOAT en regiones intestinales, detectando la presencia de numerosas células reactivas a la enzima en la mucosa intestinal (**Figura 14**), en algunas de las cuales se ha observado colocalización con su sustrato ghrelina, lo que indica que el proceso de acilación de la ghrelina puede tener lugar en el intestino del carpín.

A continuación, se analizó la distribución anatómica de la GOAT en el cerebro con el fin

de discriminar en qué regiones encefálicas se encuentra presente. Los mayores niveles de enzima se encontraron en el cerebro posterior, incluyendo el lóbulo vagal y algunos tractos de fibras. Además, se detectó una importante inmunorreactividad de la enzima en el telencéfalo, algunos núcleos hipotalámicos (núcleo preóptico, núcleo preóptico periventricular, núcleo periventricular anterior, núcleo periventricular posterior, núcleo del receso lateral, núcleo periglomerular medial y núcleo tuberal lateral inferior), la glándula pineal, el techo óptico y el cerebelo (**Figura 14**). Las áreas del cerebro anterior que revelan GOAT son regiones que en el carpín muestran expresión del receptor de ghrelina GHS-R1a y de otras hormonas reguladoras del apetito, como la orexina y el NPY, apoyando el papel de la ghrelina como un modulador de la ingesta y el balance energético en este teleosteo. Los resultados presentes demuestran por primera vez en los peces una importante presencia de GOAT en núcleos del cerebro posterior, lo que podría estar sugiriendo nuevas funcionalidades inexploradas del sistema ghrelinérgico en estos vertebrados. Además, la presencia de GOAT en el cerebro indica una posible acilación local de la ghrelina de origen central, frente al concepto clásico de su origen y activación periféricas.

Con el objeto de estudiar los mecanismos de regulación que subyacen a la expresión de GOAT, nos planteamos si la expresión intestinal de GOAT se encuentra regulada por su sustrato, ghrelina. Para ello, realizamos cultivos de explantes primarios de intestino anterior de carpín expuestos a distintas concentraciones de ghrelina acilada de carpín durante 30, 60 y 120 minutos. Posteriormente, se cuantificó la expresión de ARNm de *goat* y la cantidad de proteína mediante RT-qPCR y *Western blot*, respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que la ghrelina acilada ejerce una inhibición tiempo-dependiente de la expresión y cantidad de la enzima en el intestino del carpín *in vitro* (**Figura 14**). Estas observaciones sugieren que si existiese un exceso de ghrelina acilada, se activaría un mecanismo de inhibición de GOAT por exceso de producto (mecanismo habitual en los sistemas de control enzimático) con el fin de disminuir su síntesis.

Por último, para completar la caracterización de la GOAT en el carpín, hemos estudiado la posible ritmicidad en la expresión del gen que la codifica, así como la influencia del horario de alimentación sobre la misma. Para ello, ejemplares de carpín se aclimataron a un fotoperiodo de 12 horas de luz:12 horas de oscuridad (12L:12D; encendido de las luces a las 08:00) y alimentación a las 14:00 (mitad de la fotofase) o a las 2:00 (mitad de la escotofase). Tras tres semanas de aclimatación, los ejemplares fueron sacrificados a lo largo de un ciclo completo de 24 horas a intervalos de 4 horas, comenzando a las 13:00, lo que corresponde con el tiempo *zeitgeber* 5 (ZT-5). La expresión de *goat* se analizó en el telencéfalo, hipotálamo, lóbulo vagal, hipófisis y bulbo intestinal mediante RT-qPCR. Los resultados de este

experimento mostraron que, en los peces alimentados durante la fase diurna, la *goat* exhibe una oscilación rítmica en su expresión en el hipotálamo, la hipófisis y el bulbo intestinal, con los niveles máximos (acrofase) observados durante la fase nocturna en los tres tejidos (**Figura 14**). La amplitud del ritmo diario en la hipófisis fue aproximadamente cuatro veces mayor que en el hipotálamo y el bulbo intestinal, y además su acrofase se detectó unas 4-7 h más tarde en comparación con estos otros dos tejidos. Un hallazgo interesante es que estos patrones rítmicos de expresión observados para la *goat* en peces alimentados durante la fase diurna del ciclo de 24 h desaparecen cuando la alimentación tiene lugar durante la fase nocturna. Estos resultados sugieren que los ritmos diarios de expresión de *goat* están relacionados con el horario de alimentación y dependen de la fase del fotociclo en que se realiza la ingesta. La expresión rítmica de *goat* descrita por primera vez en el presente estudio apoya la existencia de una interacción entre los sistemas ghrelinérgico y circadiano, y apunta a la funcionalidad del sistema ghrelinérgico como una señal de salida del sistema circadiano.

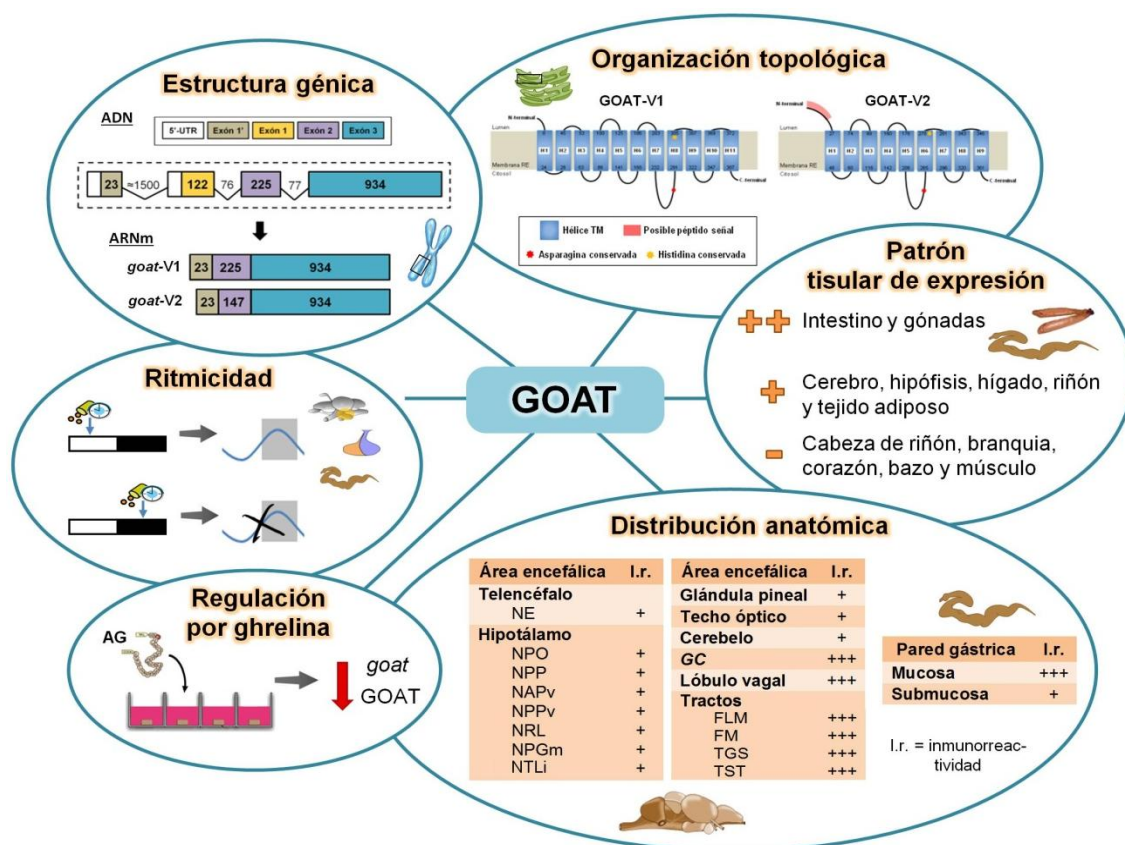


Figura 14. Principales resultados obtenidos en la caracterización de la ghrelina O-aciltransferasa en el carpín. AG, ghrelina acilada; FLM, fascículo longitudinal medial; FM, fascículo de Mauthner; GC, *griseum centrale*; GOAT, ghrelina O-aciltransferasa; NAPv, núcleo periventricular anterior; NE, núcleo entopeduncular; NPGm, núcleo periglomerular medial; NPO, núcleo preóptico; NPP, núcleo preóptico periventricular; NPPv, núcleo periventricular posterior; NRL, núcleo del receso lateral; NTLi, núcleo tuberal lateral inferior; TGS, tracto gustativo secundario; TST, tracto espinotalámico.

En conclusión, en el Capítulo I de esta Tesis Doctoral se ha determinado la secuencia génica y la topología de la enzima GOAT del capín, así como su patrón de distribución tisular y la regulación de su expresión génica y proteica por un mecanismo de inhibición por exceso de producto. Además, hemos demostrado que la enzima muestra una ritmicidad diaria en su expresión vinculada al horario de alimentación, sugiriendo una implicación del sistema ghrelinérgico en el sistema circadiano de estos teleósteos. El hecho de que las líneas celulares transfectadas con el ADN copia de ambas variantes de la *goat* del carpín transcriban pero no traduzcan la proteína indica que podría existir una incompatibilidad en el uso de codones durante la traducción entre los mamíferos e insectos y los peces. Experimentos actualmente en curso en nuestro grupo de investigación buscan comprobar la eficacia del proceso de traducción de la GOAT del carpín en líneas celulares de peces.

Los resultados presentados en este capítulo han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

- Blanco AM, Gómez-Boronat M, Alonso-Gómez AL, Yufa R, Unniappan S, Delgado MJ, Valenciano AI (2017) Characterization of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in goldfish (*Carassius auratus*). *PLoS ONE* 12: e0171874.
- Blanco AM, Sánchez-Bretaña A, Delgado MJ, Valenciano AI (2016) Brain mapping of ghrelin O-acyltransferase in goldfish (*Carassius auratus*): novel roles for the ghrelinergic system in fish? *Anat Rec* 299: 748-758.

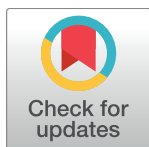
RESEARCH ARTICLE

Characterization of Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) in goldfish (*Carassius auratus*)

Ayelén Melisa Blanco¹, Miguel Gómez-Boronat¹, Ángel Luis Alonso-Gómez¹, Roman Yufa², Suraj Unniappan³, María Jesús Delgado¹, Ana Isabel Valenciano^{1*}

1 Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **2** Department of Biology, York University, Toronto, Ontario, Canada, **3** Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Department of Veterinary Biomedical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada

* aivalenciano@bio.ucm.es



Abstract

Ghrelin is the only known hormone posttranslationally modified with an acylation. This modification is crucial for most of ghrelin's physiological effects and is catalyzed by the polytopic enzyme ghrelin O-acyltransferase (GOAT). The aim of this study was to characterize GOAT in a teleost model, goldfish (*Carassius auratus*). First, the full-length cDNA sequence was obtained by RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends methods. Two highly homologous cDNAs of 1491 and 1413 bp, respectively, named *goat-V1* and *goat-V2* were identified. Deduced protein sequences (393 and 367 amino acids, respectively) are predicted to present 11 and 9 transmembrane regions, respectively, and both contain two conserved key residues proposed to be involved in catalysis: asparagine 273 and histidine 304. RT-qPCR revealed that both forms of *goat* mRNAs show a similar widespread tissue distribution, with the highest expression in the gastrointestinal tract and gonads and less but considerable expression in brain, pituitary, liver and adipose tissue. Immunostaining of intestinal sections showed the presence of GOAT immunoreactive cells in the intestinal mucosa, some of which colocalize with ghrelin. Using an *in vitro* approach, we observed that acylated ghrelin downregulates GOAT gene and protein levels in cultured intestine in a time-dependent manner. Finally, we found a rhythmic oscillation of *goat* mRNA expression in the hypothalamus, pituitary and intestinal bulb of goldfish fed at midday, but not at midnight. Together, these findings report novel data characterizing GOAT, and offer new information about the ghrelinergic system in fish.

OPEN ACCESS

Citation: Blanco AM, Gómez-Boronat M, Alonso-Gómez ÁL, Yufa R, Unniappan S, Delgado MJ, et al. (2017) Characterization of Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) in goldfish (*Carassius auratus*). PLoS ONE 12(2): e0171874. doi:10.1371/journal.pone.0171874

Editor: Nicholas S Foulkes, Karlsruher Institut für Technologie, GERMANY

Received: October 31, 2016

Accepted: January 26, 2017

Published: February 8, 2017

Copyright: © 2017 Blanco et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data availability statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO; AGL2016-74857 C3-2-R) to MJD, and partly by a Discovery Grant (341292-2012-RGPIN), and Discovery Accelerator Supplement (429436-2012-RGPAS) award from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, an Establishment grant from

Introduction

Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is a member of the membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) family [1], previously known as MBOAT4 [2–5]. It is responsible for the attachment of a medium-chain fatty acid, typically octanoate, to the third amino acid (a serine residue) of the N-terminal region of ghrelin, a peptide hormone mainly synthesized by the gut [6]. This posttranslational acyl modification of ghrelin is essential for the peptide to bind to its

Saskatchewan Health Research Foundation (SHRF) and John R. Evans Leaders Fund from the Canada Foundation for Innovation to SU. AMB and MGB are predoctoral fellows from the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte and MINECO, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

receptor, the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R), and so to exert most of its physiological functions [6]. This includes a role in a wide variety of physiological processes of all vertebrates, including fish, such as stimulation of growth hormone release from the pituitary, stimulation of food intake, carbohydrate utilization and adiposity and regulation of insulin secretion, among others [7–11]. In the last decade, ghrelin has also been involved in the circadian system of both mammals and fish, where it might act as both an input [12–14] and an output signal [15]. Although acylated ghrelin (acyl-GRL) is typically considered as the active form of the hormone, studies have recently shown that deacylated ghrelin (desacyl-GRL) also has some biological functions in vertebrates [16–18].

The identification of GOAT occurred in 2008 by two independent research groups who simultaneously reported the identification of the enzyme in mammals [19,20]. GOAT shares structural similarities with other members of the MBOAT family. Indeed, 16 MBOAT protein sequences have been identified from the mouse genome, and 11 putative catalytic domains are highly conserved among all the sequences, as well as the residues asparagine 307 (Asn-307) and histidine 338 (His-338) that are essential for the catalytic activity of the enzymes [20,21]. The GOAT sequence is also highly conserved across vertebrates from zebrafish to humans, with a 90% homology for human and rodent, and 59% for mammalian and zebrafish [19,22].

GOAT seems to be located in the membrane of endoplasmic reticulum and its topology in vertebrates was recently described to comprise 11 transmembrane domains (TMDs) and one reentrant loop connected by 11 exposed-loop regions [23]. The acylation process of ghrelin by GOAT occurs after the signal sequence from pre-pro-ghrelin is cleaved by a signal peptide peptidase to form pro-ghrelin, which can be produced either as acylated or unacylated pro-ghrelin [4,24]. Acylated pro-ghrelin is produced when GOAT in the endoplasmic reticulum translocates mainly octanoyl-CoAs from the cytosolic side to acylate the precursor. In this regard, GOAT has been postulated to be a possible acyl-CoA transporter. Ghrelin-derived peptides as short as four amino acids can be acyl-modified by GOAT [25], suggesting that it is likely that GOAT recognizes a N-terminal four-amino acids motif within the intact pro-ghrelin peptide. Once in the Golgi, pro-protein convertases 1/3 and 2 cleave acylated or unacylated pro-ghrelin to form mature forms of ghrelin, which are packaged into vesicles and released into the circulation [4,24]. Although mature ghrelin can be synthesized as both acyl-GRL and desacyl-GRL, ghrelin can also be deacylated by the acyl-protein thioesterase 1/lisophospholipase I mainly released from the liver [26].

In rodents, the highest levels of GOAT mRNAs are found in the stomach and intestine followed by the testis [20], and pancreas [27]. GOAT was found to be localized within the ghrelin producing cells in stomach and duodenum of mice and rats [28,29]. Interestingly, it was estimated that about 15% of the GOAT expressing cells in the gastric mucosa did not coexpress ghrelin, suggesting the existence of other endogenous substrate for this enzyme. In humans, Gutierrez and coworkers [19] demonstrated that *goat* transcript levels are more abundant in stomach and pancreas, whereas Lim and coworkers [30] found the highest expression in adrenal cortex, spleen and lung. Expression of *goat* in mammalian tissues was also described in the hypothalamus, pituitary, taste cells, heart, kidney, adipose tissue, ovary, placenta, muscle, serum and chondrocytes [28,31–33]. Recently, the tissue expression pattern of *goat* has been described in zebrafish, where high levels of mRNA expression were observed in gut, brain and gonads [22].

The importance of ghrelin acylation for the functioning of the ghrelinergic system in all vertebrates, including fish [18], led us to characterize GOAT in a teleost model, the goldfish (*Carassius auratus*). To achieve that purpose, we first obtained the full-length cDNA sequence of GOAT, and we carried out both an *in silico* structural and phylogenetic analyses of the sequence obtained. Second, we characterized the distribution of the enzyme mRNAs in central

and peripheral tissues, as well as its distribution in the intestine in relation to its substrate ghrelin. Third, we studied the possible modulation of GOAT by ghrelin using a primary intestinal culture system. Finally, considering the recent proposal of a crosstalk between ghrelin and the circadian system [34] and the fact that daily expression rhythms have been described for ghrelin and its main receptor in goldfish [15], we studied the daily expression profile of *goat* in central and peripheral tissues of goldfish. Given the relevance of the ghrelinergic system on feeding [9,35], we also determined the possible influence of feeding time on such daily profiles.

Materials and methods

Animals and sampling

Goldfish with a body weight of 27 ± 7 g were obtained from a local commercial supplier in Madrid (Madrid, Spain) for all the studies, except for the immunohistochemistry and *in vitro* assays for which goldfish were obtained from a commercial supplier in Calgary (Alberta, Canada). Fish were housed in 60 L aquaria ($n = 10/\text{aquarium}$) with filtered fresh water ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and continuous aeration, and maintained under a 12 h of light: 12 h of darkness (12L:12D) photoperiod (lights on at 08:00 h). Food from a commercial flake diet (1% body weight, Sera Pond, Heinsberg, Germany) was offered daily at 10:00 h for at least two weeks before the assays. For the experimental procedures, fish were anesthetized with tricaine methanesulfonate (MS-222, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and sacrificed. Sample collection is detailed below for each study. All procedures carried out at the University of Madrid were approved by the Animal Experimentation Committee of Complutense University, and performed according to the European Communities Council Directive (2010/63/UE). For the studies conducted at the University of Saskatchewan, all animal use and care strictly followed the regulations of the Canadian Council for Animal Care and were approved by the institutional animal research ethics committee (Protocol # 2012–0082).

Identification of GOAT cDNA sequence

To obtain a partial sequence of goldfish *goat*, one fish was sacrificed at 11:00 h, no feeding the sampling day, and the intestinal bulb was collected. Total RNA was isolated using TRI Reagent (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. Then, an aliquot of 1 μg of total RNA was reverse transcribed into cDNA in a 25 μL reaction volume using random primers, RNase inhibitor and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The reverse transcription reaction conditions consisted in 25°C for 10 min, an extension of 50 min at 42°C and a denaturalization step at 70°C for 15 min. The first strand cDNA fragments obtained were used as a template to amplify *goat* using various sets of primers (Table 1), all obtained from Sigma-Aldrich. Primers were hand-made designed by selecting convergent parts between the enzyme nucleotide sequence of *Danio rerio* (GenBank ID: NM_001122944.1) and *Astyanax mexicanus* (Ensembl ID: ENSAMXT00000014838) using an alignment tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). The PCRs were performed in a 25 μL reaction volume containing 1.25 U of TaqDNA Polymerase recombinant, PCR Buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM of MgCl_2 , 0.2 mM of dNTP mixture (all from Invitrogen), 0.2 μM of each forward and reverse primer and 1–2 μL of cDNA. Reaction conditions underwent an initial incubation at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles of 94°C for 45 sec, $57^\circ\text{C}/60^\circ\text{C}$ for 30 sec and 72°C for 1 min, with a final extension step at 72°C for 10 min. For some reactions, touchdown PCRs were performed. PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel. Single bands for each PCR were purified using GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) and sequenced (Secugen, Madrid, Spain). The nucleotide deduced sequences were analyzed with

Table 1. Primers designed for cloning and expression analysis of *goat*.

Primer name	Sequence (5' to 3')	Application
GOAT Forward 1	GCTATTGCAACAATGGGTCCATA	Partial cloning
GOAT Forward 2	CTGCAGATGTGTTGGCAAAC	Partial cloning
GOAT Forward 4	ATTGCTGTTCTTCAGTGCCG	RT-qPCR
GOAT Forward 5	TGATGACACAGAGGGTTTCTTCTC	Full-length sequence
GOAT Forward 6	TCTCTTGATCTGCAGGAAGGAAC	Full-length sequence
GOAT Forward 7	TTGAGTCGTCTTCACGCTTT	Full-length sequence
GOAT Forward 8	GGCCTTCATCCAGGTCAGATTC	Full-length sequence
GOAT Forward 9	CTGGTCTGTACCGTGCAA	Full-length sequence
GOAT Forward 11	CACTCCAGTAAGGTCTGTTGG	Full-length sequence
GOAT Forward 13	TCCAGTAAGGTCTGTTGGCAC	Full-length sequence
GOAT Forward V1	CACTGGGAGGATTTCATCTTGC	RT-qPCR
GOAT Forward V2	TCAGAATCTGTGCCGTCTT	RT-qPCR
GOAT Reverse 2	TCTTGAAGCCAGTATATCTGGTACTG	Partial cloning, Full-length sequence
GOAT Reverse 3	GCAAAGTGGACCTCCAAGAAG	Partial cloning, Full-length sequence
GOAT Reverse 5	TGTACAAGTGCCAGACGGTT	Full-length sequence, RT-qPCR
GOAT Reverse 6	GCAGGGAAATAAAGCGAGTAGGT	Partial cloning, Full-length sequence
GOAT Reverse 8	CGGCACTGAAGAACAGCAATAAG	Full-length sequence
GOAT Reverse 10	GAAGCACTGCACTGAAGAACA	Full-length sequence
GOAT Reverse 12	TGATGCATACAGAGCACATT	Full-length sequence
GOAT Reverse 14	GCTTGATGCATACAGAGCACA	Full-length sequence
GOAT Reverse 15	GCAAGCTTGGTTAAGCTTTCATGT	Full-length sequence
GOAT Reverse V1	GCAGTCCAGTGTCCAATGA	RT-qPCR
GOAT Reverse V2	TGGTGTCTCTTGAAGCCAGT	RT-qPCR
Abridged Anchor Primer	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG	5' RACE
Universal Amplification Primer	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC	5' RACE, 3' RACE
Adapter Primer	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT	3' RACE
β -Actin Forward	CTACTGGTATTGTGATGGACT	RT-qPCR
β -Actin Reverse	TCCAGACAGAGTATTTCGCGCT	RT-qPCR
EF-1 α Forward	CCCTGGCCACAGAGATTCA	RT-qPCR
EF-1 α Reverse	CAGCCTCGAACTCACCAACA	RT-qPCR

doi:10.1371/journal.pone.0171874.t001

the BLAST program on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

In order to obtain the *goat* full-length sequence, rapid amplification of the cDNA ends (3' RACE and 5' RACE) was performed using commercial kits (Invitrogen). PCRs were carried out using adaptor primers provided with the kits and gene-specific primers designed from the partial cDNA sequence of goldfish GOAT already obtained (Table 1). Reactions were performed in a 50 μ l final volume containing 1.25 U of *GoTaq* Hot Start Polymerase, PCR Buffer, 2 mM of $MgCl_2$ (all from Promega), 0.2 mM of dNTP mixture (Invitrogen), 0.2 μ M of each forward and reverse primer and 2 μ l of cDNA. Cycling conditions comprised an initial incubation at 94°C for 3 min, followed by 30 cycles of 94°C for 45 sec, 57°C for 30 sec and 72°C for 30 sec, with a final extension step at 72°C for 5 min. The PCR products were electrophoresed on a 1.5% agarose gel and target bands for each PCR were purified and sequenced as described above. The full-length *goat* cDNA sequence was obtained by assemblage using the DNA Baser software. Sequencing of *goat* PCR products revealed the existence of two highly homologous cDNAs that were named goldfish *goat-V1* and goldfish *goat-V2*.

The possible presence of introns within the nucleotide sequences was analyzed carrying out PCRs with genomic DNA. Genomic DNA was isolated from Trizol samples after the RNA-containing aqueous phase had been removed. PCRs were performed as above described using *GoTaq* Hot Start Polymerase (Promega) and PCR products were purified and sequenced. The nucleotide sequences retrieved from the DNA sequencing service were aligned with the full-length GOAT DNA sequence obtained using a web aligning tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) to identify the presence of introns.

In silico structural and phylogenetic analyses

An *in silico* structural analysis of both GOAT sequences obtained was carried out using various online bioinformatics tools. The predictions of protein molecular weight and other basic properties were carried out using the ProtParam tool from ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>). The presence and sequence of signal peptide were predicted using SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Topology prediction servers, including DAS (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>), MemBrain (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/>), MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>), Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>), PredictProtein (<http://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/>), Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/>), SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) and TopPred 1.10 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>), were used to predict the topological organization of the enzyme. Finally, a phylogenetic analysis was performed by aligning the goldfish GOAT amino acid sequences with those of other vertebrates retrieved from GenBank and Ensembl Genome using the Clustal-W2 tool (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). A phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method, with 1000 replicates for the bootstrap test, using MEGA6 [36]. The elephant shark (*Callorhynchus milii*) was considered as outgroup in the phylogenetic analysis given the basal phylogenetic position of cartilaginous fish and their relevance in the study of the evolution of genes and gene regulation in vertebrates.

Tissue distribution of *goat* mRNA using RT-qPCR

The expression pattern of the two identified splice variants of *goat* in goldfish tissues was studied using real-time reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). Samples of brain, pituitary, head kidney, gills, heart, esophagus, intestinal bulb, anterior intestine, middle intestine, posterior intestine, liver, spleen, kidney, gonads, adipose tissue and muscle (n = 4) were collected. Total RNA extraction and reverse transcription of 2 µg of RNA were performed as above described. Then, a real-time or quantitative PCR (qPCR) was performed using iTaq[®] Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA). The specific primers sequences used for target gene *goat* and reference gene *elongation factor 1α* (*ef-1α*; accession number AB056104) were ordered to Sigma-Aldrich and are shown in Table 1. Each set of primers for *goat* were designed to be specific for one of the splice variants and unable to amplify the other one (primers GOAT Forward and Reverse V1 from Table 1 were used to amplify the first variant of GOAT, and primers GOAT Forward and Reverse V2 were used for the second variant). Genes were amplified using 1 µl of cDNA and 0.5 µM of each forward and reverse primer in a final volume of 10 µl. Each PCR run included water controls in order to ensure that the reagents were not contaminated. The qPCR cycling conditions consisted of a ramp of 95°C for 30 sec and 40 cycles of a two-step amplification program (95°C for 5 sec and 60°C for 30 sec). A melting curve was systematically monitored (temperature gradient at 0.5°C/5 sec from 65 to 95°C) at the end of each run to confirm the specificity of the amplification reaction. The PCR

products were checked by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [37] was used to determine the relative mRNA expression, considering the tissue with the lowest expression levels as the relative value of '1'.

Immunohistochemical analysis of GOAT and ghrelin cellular localization within the intestine

The intestine (including esophagus, intestinal bulb and j-loop) from 72-h food deprived goldfish was collected in 4% paraformaldehyde (PFA) for 24 h. Tissues were processed (dehydrated and embedded in paraffin) and sectioned (5 μ m thickness) at the Centre for Modeling Human Disease (Toronto, Canada). Sections were deparaffinized in xylene for 10 minutes, rehydrated in increasing concentrations of ethanol, dried and treated with 3% hydrogen peroxide for 30 min at room temperature. Slides were then washed for 10 min in a solution of phosphate buffered saline (PBS) and Kodak Photo-Flo, followed by 10 min in PBS and Triton X-100, and 10 min in PBS and antibody blocking solution. Then, slides were incubated with a mixture of 1:200 primary ghrelin antibody (mouse monoclonal anti-ghrelin; catalog # ab57222; Abcam, Toronto, Canada) and 1:200 GOAT antibody (Rabbit monoclonal anti-GOAT; catalog # H-032-12; Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, USA) during 24 h. Both primary antibodies were previously validated in zebrafish [22]. The GOAT antibody targets a part of the GOAT sequence located close to the C-terminal extreme, which appears in both of the GOAT isoforms described by us. A separate set of control slides were only treated with the antibody diluent. The following day, the slides were washed and subsequently incubated in secondary antibodies for 60 minutes at 37°C. A dilution 1:200 of FITC Green was used for ghrelin and 1:300 was used for Texas-Red that bound to the GOAT primary antibody. Slides were then washed as follows: 10 min in a solution of 90 mL PBS and 600 μ l Kodak Photo-Flo, 10 min in 90 mL PBS and 1 drop Triton X-100, 10 min in 90 mL PBS and 600 μ l Kodak Photo-Flo, 10 min in 90 mL distilled water and 600 μ l Kodak Photo-Flo (three times), and 10 min in distilled water (three times). Finally, slides were mounted using Vectashield[®] mounting medium containing the DAPI nuclear fluorescent dye (Vector Laboratories, Burlington, Canada). Images of epithelial cells lining the villi were taken using a Nikon Eclipse Ti-Inverted fluorescent microscope (Nikon Canada, Mississauga, Canada) and NIS-elements imaging software (Nikon Canada).

In vitro study of the possible modulatory role of ghrelin on GOAT gene and protein levels

An explant culture was performed as previously described [38] with slight modifications. Briefly, the anterior intestine (4–5 cm after the intestinal bulb) of 24 h-fasted goldfish ($n = 6$) was removed and cut into fragments of approximately 1–2 mm width. Intestinal portions were immersed in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, New York, USA) supplemented with 44 mM sodium bicarbonate, 10% penicillin-streptomycin and 0.5% gentamicin for 1 min, and then distributed in different wells of sterile culture 24-well multidish plates. Plates were preincubated for 2 h in 1 ml of DMEM supplemented with 44 mM sodium bicarbonate, 1% penicillin-streptomycin and 0.05% gentamicin (DMEM+) at 23°C under an atmosphere of 5% CO₂ and 95% O₂. Then, medium was replaced by 1 ml of fresh DMEM+ alone or containing goldfish acylated ghrelin (0.1, 1 or 10 nM; GTS(Octanoyl) FLSPAQKPQGRPPRM; GenScript, Scotch Plains, USA), and plates were incubated for 30, 60 or 120 min. At the end of each culture time, intestine samples were collected, quickly frozen in liquid nitrogen and maintained at -80°C until analytic determinations were performed. For quantifying *goat* mRNA levels, total RNA extraction, cDNA synthesis of 1 μ g of total RNA and

qPCRs were carried out as described above. Primers used for qPCRs of *goat* (GOAT Forward 4 and Reverse 5; Table 1) were able to amplify both of the described variants of the enzyme. *Ef-1 α* and *β -actin* were used as reference genes.

For quantifying protein levels, tissues ($n = 3$) were homogenized in T-PER tissue protein extraction reagent (Thermo Fisher Scientific) followed by measurement of protein concentration by Bradford assay. The samples (containing 30 μ g protein) were prepared in 1x Laemmli buffer containing 0.2% 2-mercaptoethanol (Bio-Rad, Mississauga, Canada) and subsequently were boiled at 95°C for 10 min. Then, the whole sample volume was loaded and electrophoresed in a 8–16% Mini-PROTEAN[®] TGX[™] precast protein gel (Bio-Rad Canada). Precision plus protein[™] Dual Xtra standards (Bio-Rad Canada) was used as molecular weight marker. Following electrophoresis, proteins were transferred to a 0.2 mm BioTrace[™] nitrocellulose membrane (Bio-Rad Canada) using the Trans-Blot[®] Turbo[™] transfer system (Bio-Rad, Canada), and membrane was blocked in 1x RapidBlock[™] solution (aMReSCO, Toronto, Canada). Total GOAT protein detection was performed using rabbit polyclonal IgG to GOAT (1:5000 dilution; catalog # sc-87999; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) primary antibody. Vinculin protein was used for normalization and was detected using rabbit antiserum directed against mouse vinculin (1:2000 dilution; catalog # ab129002, Abcam). As secondary antibody, goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP conjugate (Bio-Rad Canada) diluted 1:2000 was used. For protein visualization the membrane was incubated for 5 min in Clarity[™] Western ECL substrate (Bio-Rad Canada) and imaged using ChemiDoc[™] MP imaging system (Bio-Rad Canada) with chemiluminescence detection. Blot images were plotted using ImageJ software and band density of vinculin was used to normalize GOAT protein density.

Influence of feeding time on 24-h *goat* mRNA expression

Fish maintained under a 12L:12D photoperiod were divided into two groups: one fed during the photophase (at ZT-6, midday) and the other during the scotophase (at ZT-18, midnight) with commercial flake diet during three weeks. The locomotor activity was recorded as a circadian output to ensure that fish were entrained to the different feeding conditions. For this, infrared photocells (OMRON E3S-AD12, Japan) were fixed on different parts of the aquaria walls. These cells continuously emitted an infrared light beam, which was interrupted each time a fish swam in that zone, generating an output signal. The number of light beam interruptions was automatically counted and stored every 10 min by specific software (Micronec, Spain). The experiment was carried out once fish were entrained to the different feeding conditions. The day of the experiment, fish were sacrificed in 4 h intervals throughout a complete 24-h cycle beginning at *zeitgeber* time 5 (ZT-5, 6 fish/sampling time). Food was offered as scheduled the day of the experiment. Once sacrificed, samples of telencephalon, hypothalamus, vagal lobe, pituitary and intestinal bulb were collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Sampling during darkness was conducted under dim red lighting. Total RNA extraction, cDNA synthesis of 0.3 μ g of total RNA and qPCRs were carried out as described above. Primers used for quantifying *goat* (GOAT Forward 4 and Reverse 5; Table 1) were able to amplify both of the described variants of the enzyme. *Ef-1 α* and *β -actin* were used as reference genes. For the determination of the relative mRNA expression using the 2- $\Delta\Delta$ Ct method [37], the relative value of '1' was assigned to the sampling time with the lowest expression values.

Statistics

Statistical differences in GOAT mRNA or protein expression among different tissues (for the tissue distribution study), different experimental groups (for the *in vitro* assay) and different time points (for the circadian study) were assessed by one-way ANOVA followed by post-hoc

Student-Newman-Keuls multiple comparison test, after data were checked for normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene's test). Data that failed one of these requirements were log-transformed and re-checked. Analyses were carried out using Sigma-Stat 12.0 statistics package and significance was assigned at $p < 0.05$. In addition, the rhythmicity of gene expression for Section 2.7 was assessed by cosinor analysis, by fitting periodic sinusoidal functions to the expression values for the genes across the six time points. The formula used was $f(t) = M + A \cos(\pi/12 - \phi)$, where $f(t)$ is the gene expression level in a given time, the mesor (M) is the mean value, A is the sinusoidal amplitude of oscillation, t is time in hours and ϕ is the acrophase (time of peak expression). Non-linear regression allows the estimation of M , A , and ϕ , and their standard error (SE) [39]. Significance of cosinor analysis was tested using the zero-amplitude test, which indicates if the sinusoidal amplitude differs from 0 with a given probability [40]. Circadian variations were considered to be significant when $p < 0.05$ by ANOVA, and $p < 0.005$ by the zero-amplitude test with cosinor analysis.

Results and discussion

Two variants of GOAT are identified in goldfish

The identification of GOAT full-length sequence from goldfish tissues allowed us to distinguish the presence of two transcripts of 1491 and 1413 bp, respectively, named goldfish *goat-V1* and *goat-V2* (GenBank accession numbers KX953158 and KX953159, respectively). The nucleotide sequences of both variants are identical, except for 78 nucleotides (located between positions 23 and 101) that are present in *goat-V1* and missing in *goat-V2* (Fig 1). The structure of the gene encoding GOAT is conserved along the phylogeny, from fish to mammals, and responds to a 3 exons and 2 introns-gene [19]. Our results from PCRs using genomic DNA demonstrated that the goldfish *goat* has such typical 3 exons:2 introns structure, but, contrary to what expected, the first exon in goldfish is not homologous to the first exon of *goat* in other vertebrates. An *in silico* analysis of the *goat* sequences of other members of the Cyprinidae family (*Danio rerio*, *Sinocyclocheilus sp.* -horned golden-line barbel- and *Cyprinus carpio*) has revealed the presence of this different exon 1 (referred to as exon 1') in their genome, with an extremely high degree of identity in all the species (S1 and S2 Figs). Both this exon 1' and the typical exon 1 are present in the genome of zebrafish, horned golden-line barbel, and common carp, indicating that the *goat* gene in these fish species would actually contain four exonic sequences (S1 Fig). The typical exon 1 is also present in the goldfish genome, as revealed by present results (S1 and S3 Figs). Thus, the goldfish *goat* gene would also be composed of four exons (1', 1, 2 and 3) of 23, 122, 225 and 934 bp, respectively, separated each other by intronic sequences (Fig 2A and S1 Fig). The intron 1' (between exons 1' and 1), based on homology among species, seems to have around 1500 bp, while the introns 1 (between exons 1 and 2) and 2 (between exons 2 and 3) are shorter and are formed by 76 and 77 bp, respectively (Fig 2A and S1 Fig). These two introns are identical in both goldfish *goat* forms (V1 and V2), and their nucleotide sequences are shown in Fig 2B and 2C, respectively. Alignment of these sequences with the deduced intronic nucleotide sequences of the common carp revealed an extremely high percentage of similarity between the two species for the two introns.

It must be highlighted that either the exon 1' or the exon 1 are transcribed into mRNA. That means that if transcription begins in exon 1, the resulting mRNA is composed of transcripts from exon 1, exon 2 and exon 3, which is the case of the typical *goat* found in most vertebrates. However, experimental evidences presented here point out that the exon 1' is to be transcribed in the goldfish, so resulting in a mRNA composed of transcripts from exon 1', exon 2 and exon 3. If exon 2 is fully transcribed, that would result in *goat-V1*, while *goat-V2* would be generated by alternative 3' splice site selection at this exon (Fig 2A and S1 Fig).

```

TGC TGC TCG TCG GGC TCC GCA AAA ACA ACT CCA AAT ATG TTC AAA GGA AGA CTT AAC GGA 60

GAA AAA CAC TCC AGT AAG GTC TGT TGG CAC ACA AAG AGC GTG TAA CCT ACA TTT CTC GCT 120
      ★gt--gtaag ≈1700 bp)
CAG ATG GAC TCC TTT GTC AGA ATC TGG TAT GTC TAT TTG ACA CTG GGA GGA TTC ATC TTT 180
      M D S F V R I W Y V Y L T L G G F I F
GCT ATT CTA ACA ATG GGT CCA TAC AGC TTA TTG CTG TTC TTC AGT GCC GTC CTT CTC CTG 240
      A I L T M G P Y S L L L F F S A V L L L
CTG CTG ATA TAT TGT CTA CAC CCA ACG CAT ATT CAT CAT TGG ACA CTG GGA CTG CAG ATG 300
      L L I Y C L H P T H I H H W T L G L Q M
TGT TGG CAA ACC GTC TGG CAC TTG TAC ATC CAG TAC CAG TTA TAC TGG CTT CAA GAG ACA 360
      C W Q T V W H L Y I Q Y Q L Y W L Q E T
      ★gtatt--aacag (77 bp)
CCA GAC TCC AGG CTA TTA CTG GCC ATA TCT GCT CTA ATG TTG ATG ACA CAG AGG GTT TCT 420
      P D S R L L A I S A L M L M T Q R V S
TCT CTA TCT CTT GAT CTG CAG GAG GGA ACA ATC ACT AGT TCT TTT CAA AAC AGC AGT CAA 480
      S L S L D L Q E G T I T S S F Q N S S Q
GAT CTG TCT GTC CTT ATA CCA TTT CTA AGC TAC TCG CTT AAT TTT CCT GCA CTT CTT GGA 540
      D L S V L I P F L S Y S L N F P A C T T G
GGG CCA CTT TGC AGT TTT AAC ACT TTC GTG CAG TCT GTT AGG CAA ATG AGT GTG ACT CCA 600
      G P L C S F N T F V Q S V R Q M S V T P
CCT TTG ACT CCA TAT TTA AGG AGA CTT ACT TCA AAG ATA TTG CAA GTT ATA ATT TTG GTG 660
      P L T P Y L R R L T S K I L Q V I I L V
TGG ATT AAA TAT CCT CTC AAG GAG CTC TTA AAA TCA ATC ACA TTT AGA GTA AAC AGC CCT 720
      W I K Y P L K E L L K S I T F R V N S P
TGC GTT TGT CAA AAC ATA ATA TGG ATC TGG ATC CTG TCG CTG CTA CTT AAG ATG AAC TAT 780
      C V C Q N I I W I W I L S L L L K M N Y
TAT GCA CAC TGG AAG GTC AGT GAA TGT GTT AAC AAT GCT GCA GGC ATA GGT TTC CAT GGG 840
      Y A H W K V S E C V N N A A G I G F H G
TAC AGT CAC AGT GGA AAA AAA TCA TGG GAT GGG TTT TCT GAT GGC AGT CCA TGG GTC ACT 900
      Y S H S G K K S W D G F S D G S P W V T
GAA GCA TTG AGT CGT CCT TCA GCG TTT GCA CGC CAG TGG AAC AGA ACC ACG GCA GTG TGG 960
      E A L S R P S A F A R Q W N R T T A V W
CTT CGA AGA ATG GTC TTC AAA AGA TCC AAC AGA TCT CCA CTG TTT ATG ACC TTT TTG TTT 1020
      L R R M V F K R S N R S P L F M T F L F
TCA GCA TGG TGG CAT GGC CTT CAT CCA GGT CAG ATT CTG GGC TTT ATC ATC TGG TCT GTC 1080
      S A W W H G L H P G Q I L G F I I W S V
ACC GTG CAA GGG GAC TAT AAA ATG CAT CAC TTC TTG CAT CCA ATG CTT ACC TCC AAG TGG 1140
      T V Q G D Y K M H H F L H P M L T S K W
AGG AAA TGG CTG TAT GTG TGT TTA AAC TGG GCT TTT ACT CAA CTG ACC ATT TCA TGT GTT 1200
      R K W L Y V C L N W A F T Q L T I S C V
GTT GTC TGT GTG GAG CTC CAG AGC TTG GAG TCA GTG AAA CTG CTC TGG TGT TCA TAT ATC 1260
      V V C V E L Q S L E S V K L L W C S Y I
GCT GTG CTT CCA CTA CTG AGT GTT CTA ATA ATT ATA ATC CTG TGA GAA ATT CAC AGA AGC 1320
      A V L P L L S V L I I I I L
AGC ATT AAC TAT ACA AAT GTA ATA CAA ATA TGT CAT CAA ATA TCT AAT TAA ATA TAG TAA 1380

ACA TGA AAG CTT AAC CAC GCT TGC ATG ATT AGC AAG AAT ATT TGA GCT TAT ACC ATA TAT 1440

TAT ATT TAA TGT GCT CTG TAT GCA TCA AGC TGT ATG TCT ATA TAT AAA TAA

```

Fig 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of goldfish GOAT. The full-length sequence corresponds to GOAT-V1, and the same sequence without the shaded nucleotides and amino acids represents GOAT-V2. Both sequences are accessible through GenBank (accession numbers KX953158 and KX953159). Encoding region of sequences extends from the first methionine residue to the stop codon (asterisk, *). The red star indicates the union point between the first exon (exon 1') and exon 2. The sequence between these two exons comprises two introns (1' and 1) separated by exon 1. The green star indicates the intron between the exons 2 and 3. The 5' and 3' extremities of these intronic sequences are indicated in lowercase letters, and their size is indicated between brackets. The proposed catalytic residues of GOAT (asparagine 273 and histidine 304) are boxed.

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g001

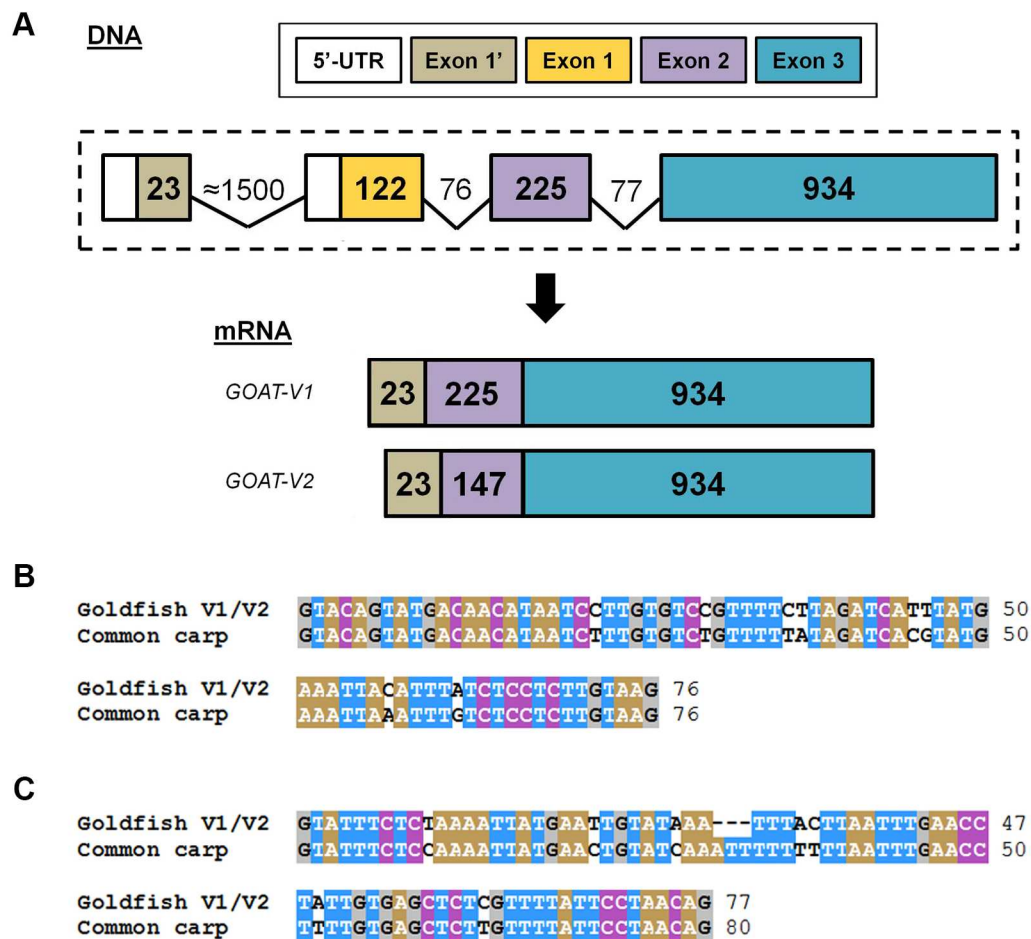


Fig 2. Exon:intron structure and proposed transcription pattern of the *goat* gene in goldfish. (A) Schematic illustration representing the proposed model for the exon-intron structure of the gene encoding GOAT in goldfish and its pattern of transcription into mRNA. Exons are indicated by boxes and introns by lines. The length (pb) of exons and introns is indicated inside the boxes (exons) or above lines (introns). (B—C) Alignment of the nucleotide sequences of the intron 1 (between exons 1 and 2, B) and intron 2 (between exons 2 and 3, C) of GOAT-V1 and GOAT-V2 DNAs with the corresponding intron sequences inferred from the common carp genome. Multiple sequence alignments were conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. Identical amino acids between the two sequences are colored. The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species name and GenBank accession number of the common carp is as follows: *Cyprinus carpio*, LHQP01003245.1(80257–80106...78407–78390).

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g002

Furthermore, two characteristics can be highlighted from the 78 nucleotide-fragment missing in *goat-V2*: i) it begins with the nucleotides GT and ends with the nucleotides AG (typical extremities of intronic sequences), and ii) its number of nucleotides is multiple of three, and so the reading frame of the protein is not altered by frame shifting. Given these facts, it can be plausible that the intron elimination occurs in sequential steps, i.e. first resulting in the *goat-V1* mRNA, and then in *goat-V2* mRNA. In addition, it is plausible that a second gene encoding *goat* might exist in goldfish, as it is present in other members of the Cyprininae subfamily, whose members underwent an additional whole genome duplication (4R) during evolution [41]. This second gene appears to be functional in species from the Barbini tribe (such as the horned golden-line barbel), but not in the Cyprinini tribe (such as the common carp). The additional intron inserted within the third exon, the four nucleotides deletions that lead to a

shift in the codon reading frame, and the presence of a premature stop codon, support the functional loss of this second *goat* gene in common carp (S1 Fig). Therefore, it is likely that goldfish, as another member of the Cyprinini tribe, also contains a second gene encoding GOAT that might have been pseudogenized.

The open reading frame of both goldfish *goat-V1* and *goat-V2* has the potential to code for a 393 and a 367 amino acid proteins, respectively. Molecular weight of GOAT-V1 and GOAT-V2 is 45.562 kDa and 42.549 kDa, respectively, and they both contain 28 positively and 14 negatively charged amino acids. It is worthy to highlight that the start codon (methionine) that initiates the translation of GOAT in many vertebrates is absent in goldfish because of the different first exon of its gene. Therefore, there might be another start codon determining the synthesis of both goldfish GOAT-V1 and GOAT-V2. In this respect, it has been reported that the methionine in position 56 is an alternate start codon in mouse GOAT [23], resulting in a shorter GOAT compared to the typical one. This methionine is present in GOAT-V1, but not in GOAT-V2; then, it is highly likely that at least the goldfish GOAT-V1 exhibits a shorter form that might be functional. However, both GOAT-V1 and GOAT-V2 have a previous methionine that could act as the start codon in goldfish GOATs, leading to functional full-lengths proteins. The alignment of the deduced amino acid sequences from the two variants of goldfish GOAT with the deduced amino acid sequences from common carp and zebrafish shows a high grade of similarity. There is also an important number of coincident amino acids with the mouse and human sequences, particularly in the regions of the protein that are encoded by the second and third exons of the genes (Fig 3). Indeed, the active core of GOAT is encoded by the last exon and it contains the two residues (asparagine and histidine) considered essential for the catalytic activity of most members of the MBOAT family, including GOAT. These residues are present in both goldfish GOAT-V1 and GOAT-V2 sequences (Figs 1 and 3).

Phylogenetic analysis comparing the goldfish GOAT amino acid sequences and those from other vertebrates positions the elephant shark GOAT in the base of the evolutionary scale, in agreement with the concept that cartilaginous fish originated before the rest of the vertebrates. The phylogenetic tree shows the existence of two clear clades that separate bony fish from tetrapodian GOAT, except for the coelacanth, an extant species of Sarcopterygii which is actually more closely related to lungfish, reptiles and mammals than to the common ray-finned fishes (Fig 4 and S4 Fig). It must be noted that the second copy of the *goat* gene of all teleosts, as a consequence of the whole genome duplication that this group of fish underwent (3R), seems to have been lost during evolution, as only one copy is found in all the species studied. Only members from the Cyprininae subfamily, which underwent an additional genome duplication (4R), have a second copy of the gene. The goldfish GOAT sequences here identified appear closely related to sequences from other cyprinids (common carp, horned golden-line barbel and zebrafish), with a strong bootstrap support (100%). Specifically, the amino acid sequence identity for goldfish GOAT compared to common carp and zebrafish was 96% and 70%, respectively. The highest sequence divergence of goldfish GOAT was observed with cock and human, sharing 39% and 38% amino acid sequence identity, respectively. These results support that a considerable grade of conservation exists among GOAT amino acid sequences across vertebrates. This sequence conservation seems to be translated also into functional terms, since the mouse, rat, and zebrafish forms of GOAT are able to acylate human ghrelin [19].

An *in silico* study was carried out to predict the topology of the newly identified variants of goldfish GOAT within the membrane of the endoplasmic reticulum. For this, a battery of web-based topology prediction servers were tested, including DAS, MemBrain, MEMSAT-SVM, Phobius, PredictProtein, Protter, SOSUI, TMHMM, TMPred and TopPred 1.10. Most servers gave very different results and predicted a very different number of TMDs; the range was from

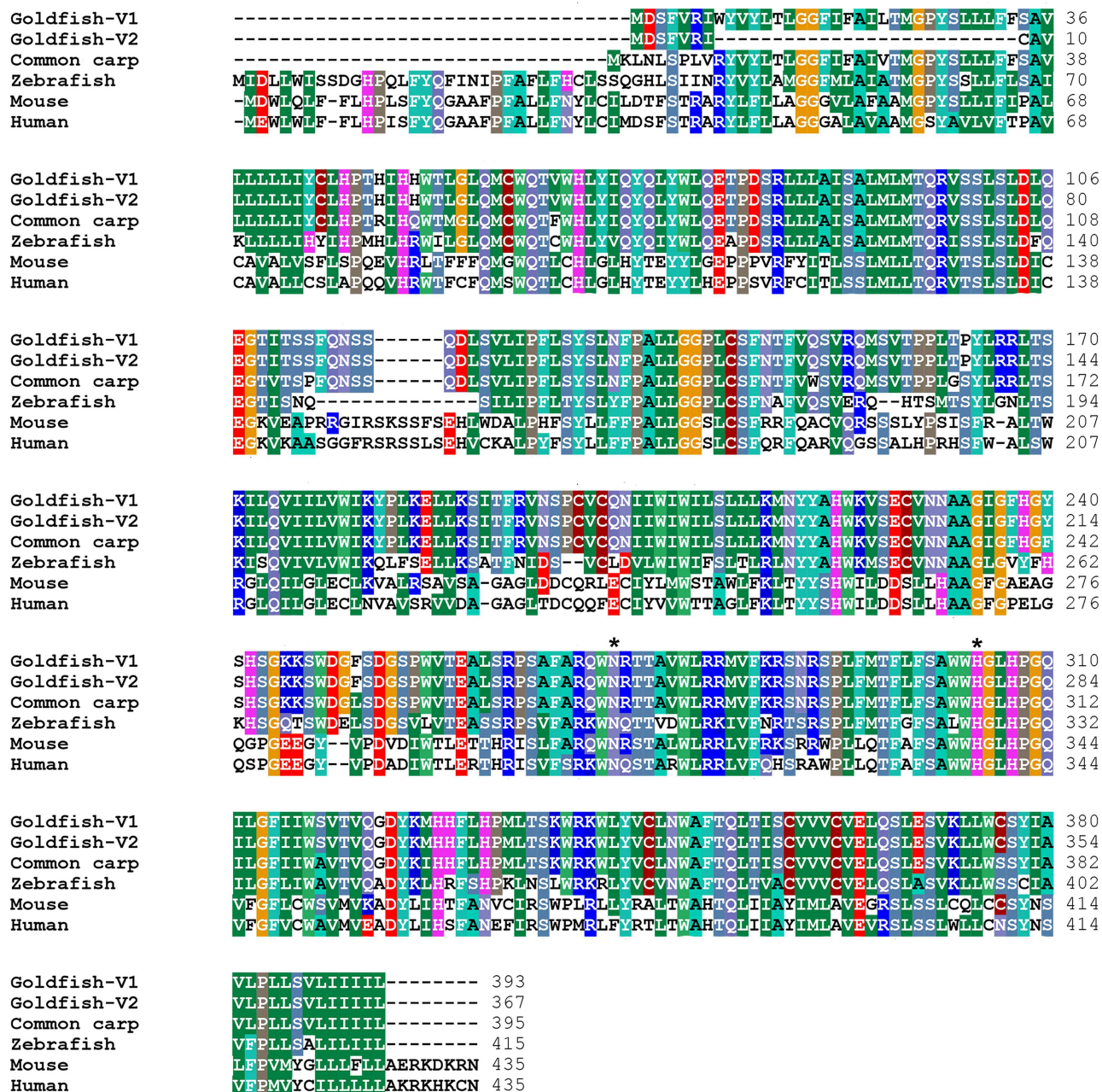
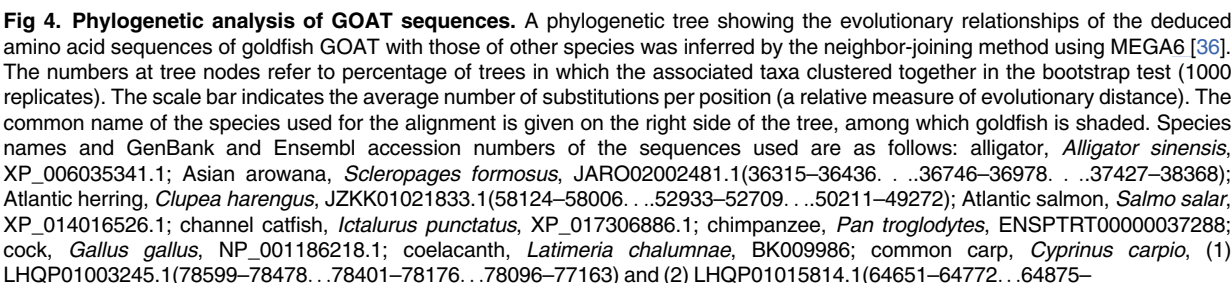


Fig 3. Alignment of the deduced amino acid sequences from goldfish GOAT-V1 and GOAT-V2 with GOAT from common carp, zebrafish, mouse and human. Multiple sequence alignment was conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. Dashed lines represent voids introduced to optimize the alignment. Identical amino acids among sequences are colored, and the proposed catalytic residues of GOAT (asparagine and histidine) are marked by asterisks. The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species names and GenBank accession numbers are as follows: common carp, *Cyprinus carpio*, LHQP01003245.1(80257–80106. ...78407–78390); human, *Homo sapiens*, ACB05873.2; mouse, *Mus musculus*, ACB05874.1; zebrafish, *Danio rerio*, CABZ01049031.1(6992–7150. ...18211–18228).

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g003

5 to 11 for GOAT-V1 and from 5 to 9 for GOAT-V2. Among the different servers tested, MemBrain [42,43] and MEMSAT-SVM [44] incorporate newer machine-learning algorithms, phylogeny and PSI-BLAST strategies, and current knowledge on membrane protein structure, such as short and very long helices and reentrant loops (also referred to as half-TMs or half-



65084...65162–65417...67215–67900); damselfish, *Stegastes partitus*, XP_008292386.1; elephant shark, *Callorhynchus milii*, BK009985; frog, *Xenopus tropicalis*, XP_002936505.2; goldfish, *Carassius auratus*, (V1) APD26025 and (V2) APD26026; horned golden-line barbel, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, (1) XP_016428796.1 and (2) XP_016383356.1; human, *Homo sapiens*, ACB05873.2; Japanese eel, *Anguilla japonica*, AVPY01018663.1(5671–5450...5379–5155...4515–3518); lizard, *Anolis carolinensis*, XP_003224702.1; Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*, XP_007253942.1; mouse, *Mus musculus*, ACB05874.1; rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, ENSOCUT00000014851; rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, CDQ71181.1; rat, *Rattus norvegicus*, ACB05875.1; red piranha, *Pygocentrus nattereri*, MAUM01004312.1(861–985...1063–1287...2692–3625); spotted gar, *Lepisosteus oculatus*, BK009987; stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, AANH01001771.1(95917–95796...95445–95215...95100–94149); striped bass, *Morone saxatilis*, JTCL01001059.1(43688–43809...44568–44792...45768–46719); tilapia, *Oreochromis niloticus*, AERX01036891.2(7728–7607...6577–6353...4935–3987); wild boar, *Sus scrofa*, ADI55170.1; yellow croaker, *Larimichthys crocea*, XP_010729215.1; yellowbelly rockcod, *Notothenia coriiceps*, AZAD01045919.1(5788–5667...5115–4891...4240–3295); zebra mbuna, *Maylandia zebra*, XP_014262684.1; zebrafish, *Danio rerio*, ACB05876.1. Nucleotide sequences were translated to amino acids using Wise2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>).

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g004

helices). Thus, results on the topological organization of both variants of goldfish GOAT were obtained from predictions from these two last servers. The topological organization predicted by MemBrain is represented in Fig 5, with a total of 11 TMDs in GOAT-V1 and 9 TMDs in GOAT-V2. This server does not predict orientation for helices, but given that the C-terminus was consistently localized in the cytosol in almost all the MBOATs studied [23,45], we assumed the same for goldfish GOAT. Considering this, both GOAT-V1 and GOAT-V2 have the N-terminus located on the luminal side and the C-terminus on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum. This orientation of both extremities is in accordance with the predicted topology of GOAT in some vertebrates, including many species of mammals, chicken, green anole, frog and zebrafish [23]. MEMSAT-SVM predictions were very similar to those from MemBrain, with two differences. First, according to this model, the amino acids predicted by MemBrain to form the TMD5 of GOAT-V1 do not constitute a transmembrane helix but they are part of the corresponding cytosolic loop. This means a total number of 10 TMDs, and the positioning of the two extremities of the protein in the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. Second, the TMD6 and TMD7 predicted by MemBrain for GOAT V2 are predicted as a unique longer TMD by MEMSAT-SVM, with a reduction of TMDs from 9 to 8, and the cytosolic location of both the N- and C-terminus of the protein. As the goldfish *goat* has a shorter first intron compared to other vertebrates and, therefore, a shorter GOAT protein, its architecture resembles the one previously described for many vertebrates [23], which comprises 11 TMDs and one reentrant loop.

According to MemBrain and MEMSAT-SVM predictions, in both variants of goldfish GOAT the conserved asparagine residue is part of a long cytosolic loop, while the conserved histidine is segregated to the luminal side of the endoplasmic reticulum membrane (Fig 5). This location of these two key residues is in accordance with the previous predicted model for GOAT topology [23]. The luminal location of histidine is in consistence with the hypothesis of a conserved luminal active site for the MBOAT family. In contrast, the cytosolic position of the asparagine suggests that it is unlikely to be directly involved in catalysis, although it might be important for substrate interactions, transport of substrates or protein structural stability, among others. Another important finding is the prediction of the existence of a peptide signal within the goldfish GOAT sequences (Fig 5). None of the prediction tools used detected a signal peptide for GOAT-V1, in agreement with the results obtained by Taylor and coworkers [23]. However, results were not so consistent for GOAT-V2. While some servers, such as SignalP4.1, MemBrain, and Protter and Phobius, predicted that the first 24 amino acids (18 according to MemBrain) of the sequence constitute a signal peptide, MEMSAT-SVM failed to detect one. This difference regarding the presence of a signal peptide in the GOAT-V2, but not in the GOAT-V1, could indicate a different subcellular location of both forms of goldfish GOAT. Further studies are required to demonstrate this hypothesis.

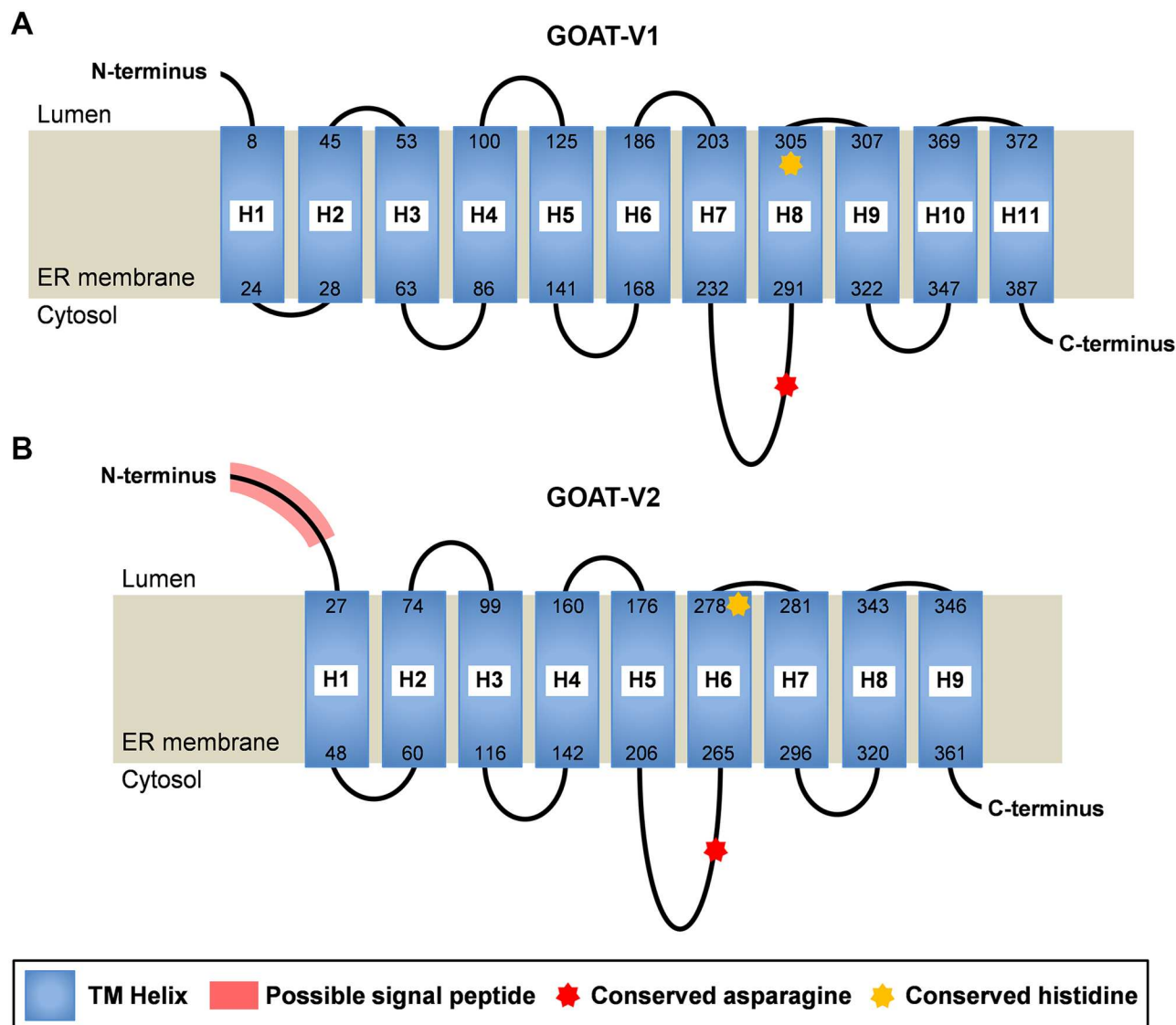


Fig 5. Predicted topological organization of goldfish GOAT-V1 (A) and GOAT-V2 (B) in the membrane of the endoplasmic reticulum. Topology was predicted using MemBrain prediction server [42,43]. Transmembrane helices are represented by blue rectangles spanning the endoplasmic reticulum membrane (gray). Black lines represent loops, and their size indicates the relative loop length (although they are not precisely scaled). GOAT-V2 is predicted to contain a peptide signal, which is shaded in the N-terminus. Positions of the two conserved catalytic residues asparagine and histidine are shown with red and yellow stars, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g005

Apart from GOAT [23], three other MBOATs have been fully mapped topologically: the human acyl-CoA:cholesterol acyltransferases 1 and 2 (ACAT1 and ACAT2) [46] and yeast glycerol uptake protein 1 (Gup1p) [45]. The topological models described for ACAT1 and Gup1p are similar to the one reported for GOAT, whereas ACAT2 shows a quite different organization. Although the number of TMDs predicted differs among these MBOATs, GOAT, ACAT1 and Gup1p have in common that the invariant histidine is luminal or buried in the endoplasmic reticulum membrane near the lumen, as reported in the present study for goldfish GOATs (Fig 5). This was also reported for the partially mapped yeast MBOATs acyltransferase for lysophosphatidylethanolamine 1 (Ale1p) and acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-related enzymes 1 and 2 (Are1p and Are2p) [45]. Furthermore, it is to note that this histidine

is in all cases part of or very close to a cytosolic loop containing only 2–3 residues, a feature that is conserved throughout the MBOAT gene family [45]. Regarding the conserved asparagine, all these previous studies reported its position as cytosolic, in accordance to our model.

The two variants of goldfish *goat* show a similar tissue expression pattern

The distribution and expression of goldfish *goat-V1* and *goat-V2* transcripts in brain and peripheral tissues of goldfish are shown in Fig 6A and 6B, respectively. Both variants of the enzyme show a similar tissue expression pattern, with the highest levels of mRNAs detected in gonads followed by the anterior intestinal tract, including the esophagus, intestinal bulb, anterior intestine and middle intestine. Lesser but significant levels of *goat* expression were found in the brain, pituitary, posterior intestine, liver, kidney and adipose tissue. It is to note that the expression of *goat-V1* in the posterior intestine and liver is higher than *goat-V2*, which is more expressed in head kidney in comparison to *goat-V1*. Expression of both forms was found to be minimal in head kidney, gill, heart and spleen, and almost undetectable in muscle.

The tissue expression pattern observed for goldfish *goat* is similar to the reported previously in other vertebrates (zebrafish, [22]; mammals, [19,20]), with high levels of *goat* mRNAs in gut and gonads. The broadly *goat* expression in the intestinal bulb and intestine in goldfish supports the functional activity of the ghrelinergic system in such locations and its relationship with feeding [35,47]. On the other hand, the high presence of *goat* transcripts in gonads supports the previously suggested involvement of ghrelin in reproduction [48]. Besides, a significant presence of *goat* has been detected in the pituitary, which may be related to the important role of ghrelin in stimulating hormone secretion (including growth hormone and luteinizing hormone) in this gland [49]. While the two forms of *goat* here identified (V1 and V2) are similarly expressed in the above mentioned locations, and so they might be equally involved in the suggested functions, their expression is quite different in the posterior intestine, liver and head kidney. This observation points out that GOAT-V1 might be involved in the actions of ghrelin in the posterior intestine and liver, while actions exerted by the ghrelinergic system in the head kidney might be carried out by GOAT-V2.

It is worthy to highlight that none of the studies analyzing the tissue expression pattern of *goat* in mammals detected mRNAs encoding the enzyme in the brain [19,20], in contrast to the significant levels found in goldfish (present results) and in zebrafish [22]. However, a significant amount of *goat* mRNAs has been detected in the rat hypothalamus [32]. These results could indicate that GOAT in mammals might be restrictedly distributed in discrete brain areas (such as the hypothalamus), and then is detected only when such discrete locations are analyzed separately, while in fish it is more widely expressed within this tissue [50]. The important presence of *goat* in the goldfish brain and gastrointestinal tract reinforces the crosstalk between these two tissues in the regulation of food intake [51].

GOAT is present in the goldfish intestinal mucosa and colocalizes ghrelin in some endocrine cells

Our findings indicate that *goat* transcripts are considerably expressed along the intestine. Then, we aimed to characterize the anatomical distribution of GOAT in the intestinal endocrine cells and whether it colocalizes ghrelin. Cross-sections of goldfish intestine stained for GOAT-like and ghrelin-like immunoreactivity are shown in Fig 7. Immunoreactivity for GOAT (red) was mainly observed within the apical region of the cells of the intestinal mucosa, and also some immunopositive cells were scattered deep within the submucosa of the villi (Fig 7A1 and 7A2). Ghrelin immunoreactivity (green) was detected both in the brush border and

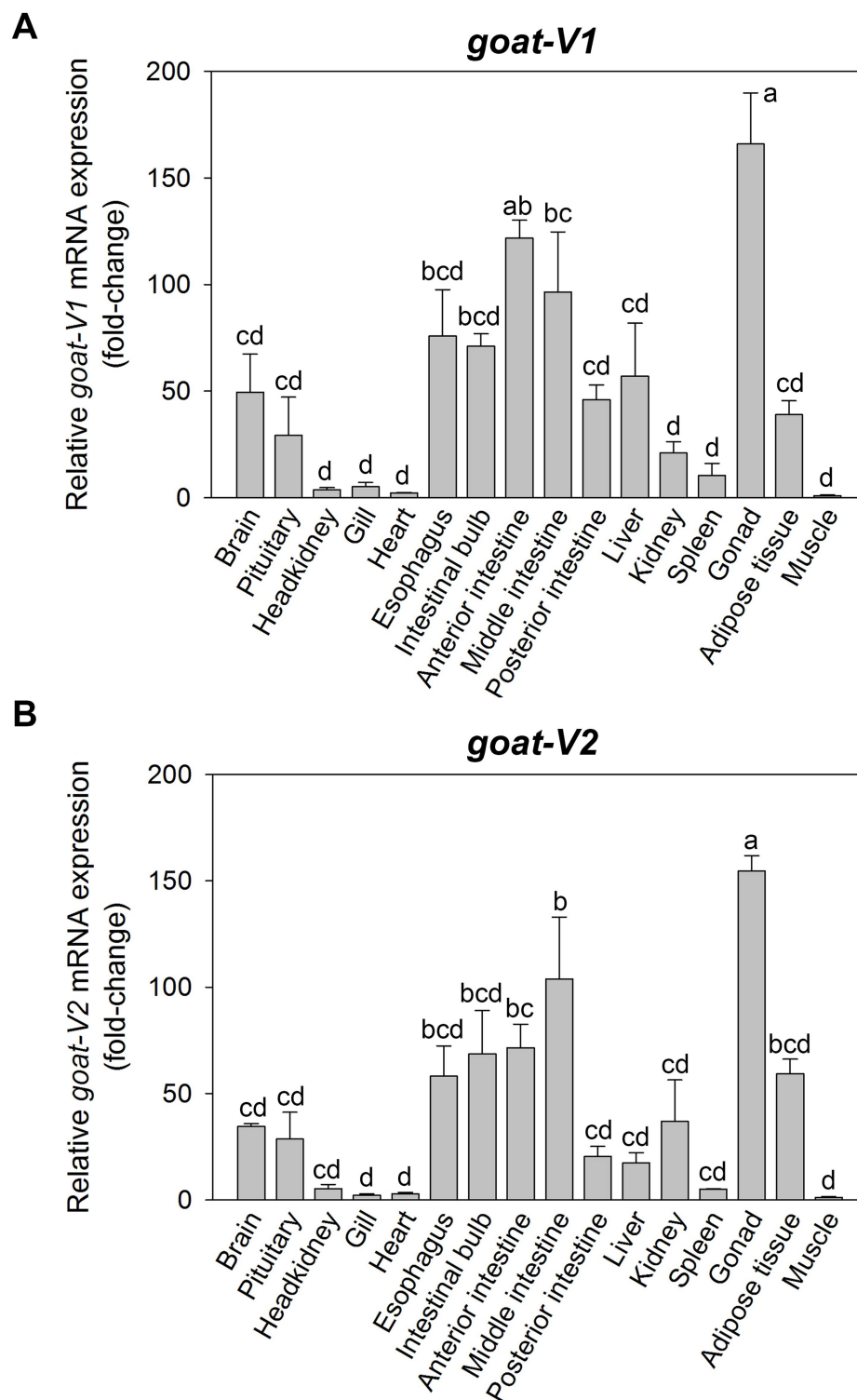


Fig 6. Tissue distribution of *goat-V1* (A) and *goat-V2* (B) mRNAs in goldfish. Quantitative analysis of mRNA expression was performed by RT-qPCR considering *elongation factor-1 α* (*ef-1 α*) as reference gene. Data are expressed as mean + SEM (n = 4), relative to the tissue with the lowest mRNA expression. Bars not showing any coincident letter indicate that their difference in mean is statistically significant, as assessed by ANOVA and post-hoc SNK test (p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g006

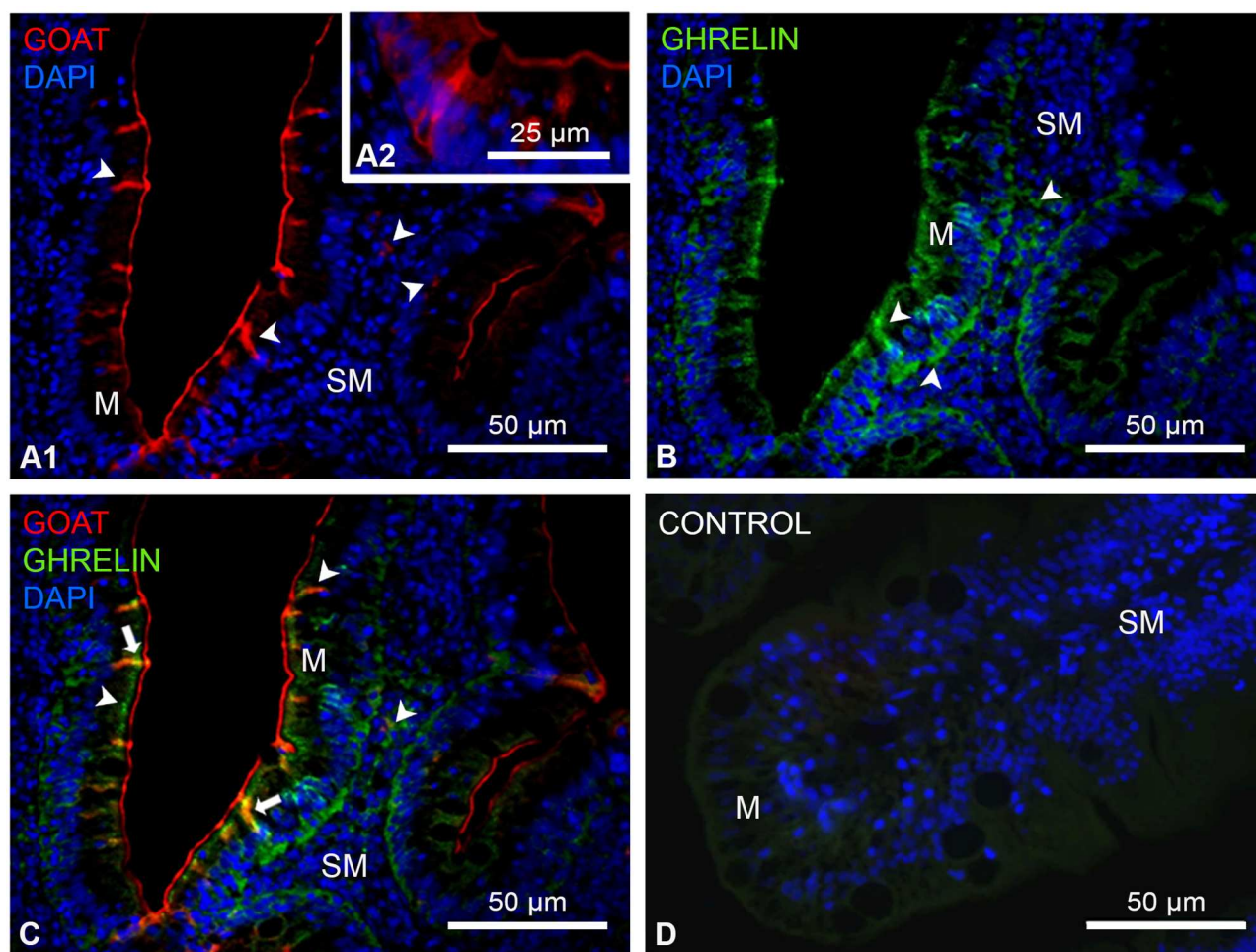


Fig 7. GOAT-like and ghrelin-like immunoreactivity in goldfish intestine detected by immunohistochemistry. Figure shows transversal representative sections of intestine showing GOAT-like (A1 and A2, red) and ghrelin-like (B, green) immunoreactivity, and merged images of GOAT and ghrelin (C, yellow). Slides labeled only with secondary antibodies were used as negative controls (D). Arrowheads indicate cells stained with either GOAT or ghrelin, and solid arrows show cells that colocalize both GOAT and ghrelin. All images are merged with DAPI showing nuclei in blue. M, mucosa; SM, submucosa. Scale bars are indicated in each image.

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g007

the basal border of the mucosa, and in the submucosa (Fig 7B). There was a small population of enteroendocrine cells colocalizing GOAT and ghrelin in the apical region of the mucosa (Fig 7C, yellow). No staining was observed in negative controls stained with secondary antibody alone, indicating that the staining is specific (Fig 7D).

The identification of GOAT immunopositive cells in the intestine of goldfish, as well as the colocalization of the enzyme with its main substrate ghrelin, is in agreement with previous observations in mammals [28,29] and with the only report in fish for the zebrafish [22]. The existence of enteric endocrine cells coexpressing GOAT and ghrelin suggests that the acylation process of ghrelin is possible inside those cells, being able to produce active ghrelin when required. However, both in the present study in goldfish and the previous reports in zebrafish, rat and mice, not all the GOAT expressing cells co-express ghrelin. The percentage of co-expression of both peptides within the gastric cells varies among species. Thus, double labeling showed that around 95% of GOAT-immunoreactive cells co-labeled with ghrelin in mice [29], around 56% in rats [29], around 25% in goldfish, and only 20% in zebrafish [22]. The reason

for this species differences remain to be explored, but the observation that some gastric/intestinal cells expressing GOAT do not co-express ghrelin suggests the existence of other endogenous substrate for this enzyme. In addition, it is noteworthy that GOAT was not detected in the intestinal muscular layer of goldfish, which is in accordance with previous observations reporting the absence of GHS-R1a in this layer [15]. These results, together with the fact that ghrelin seems not to modulate intestinal motility in goldfish [52], suggest that the ghrelinergic system is not exerting local effects affecting intestinal musculature in this teleost.

Ghrelin downregulates GOAT gene and protein in goldfish intestine *in vitro*

The effects of acylated ghrelin on the gene and protein levels of GOAT in goldfish cultured intestinal fragments are shown in Fig 8. Short time (30 min) exposure to all ghrelin concentrations tested (0.1, 1 and 10 nM) led to a significant reduction (around 2-fold) of *goat* transcript levels. This downregulatory effect on *goat* mRNA expression was also observed after 60 min incubation in the presence of lower ghrelin concentrations (0.1 and 1 nM), and disappeared at longer incubation times (120 min, Fig 8A). Incubation of intestinal fragments in the presence of ghrelin (at all the concentrations tested) also decreased significantly the intestinal levels of GOAT protein at 30 min (Fig 8B; see also S5 Fig).

Present results indicate that acylated ghrelin exerts a time-dependent inhibition of *goat* transcription and translation in the goldfish intestine *in vitro*. This observation is in agreement with the reduction of *goat* transcripts in the brain and gut induced by intraperitoneal injection of ghrelin in zebrafish [20]. However, present results show for the first time that this inhibitory role of ghrelin on GOAT occurs directly in the intestine. The existence of this mechanism is also supported by an *in vitro* assay in insect cells showing that mouse octanoylated ghrelin (1–28) and octanoylated ghrelin pentapeptide inhibit GOAT activity [53]. Together, these results points toward a possible feedback inhibition of GOAT by acylated ghrelin when an excess of this form of hormone is present in the system, highlighting the existence of a strict control on ghrelin acylation.

Goat is expressed rhythmically in the hypothalamus, pituitary and intestinal bulb of goldfish fed at midday

The daily pattern of *goat* expression in intestinal bulb, hypothalamus, pituitary, telencephalon and vagal lobe of goldfish fed either during the photophase or during the scotophase throughout a 12L:12D photocycle is shown in Fig 9. No differences in *goat* expression were detected throughout the 24-h cycle when fish were fed at midnight in any of the studied tissues, except in the telencephalon, where the ANOVA detected significant higher amount of *goat* transcripts at the end of the darkness compared to the midday values, but without daily significant rhythm (Fig 9B, 9D, 9F, 9H, and 9J). However, when fish were fed at midday, statistical significant differences among time points were detected in almost all the tissues (Fig 9A, 9C, 9E, 9G, and 9I), which resulted in significant daily rhythms in intestinal bulb, hypothalamus and pituitary. In these three tissues, the acrophase (time when the highest abundance of mRNAs was detected) took place during the dark phase, although in the case of the hypothalamus and intestinal bulb it was observed at the beginning of the mentioned phase whereas in pituitary it occurred at the end (Table 2). Additionally, the amplitude of *goat* daily rhythm was around 4-fold higher in pituitary compared to the hypothalamus and intestinal bulb (Table 2). Expression of *goat* was not significantly modified throughout the 24-h cycle in goldfish vagal lobe (Fig 9I and 9J). Record of the fish locomotor activity shows that both groups of fish clearly entrained their locomotor pattern to the feeding regimen (data not shown).

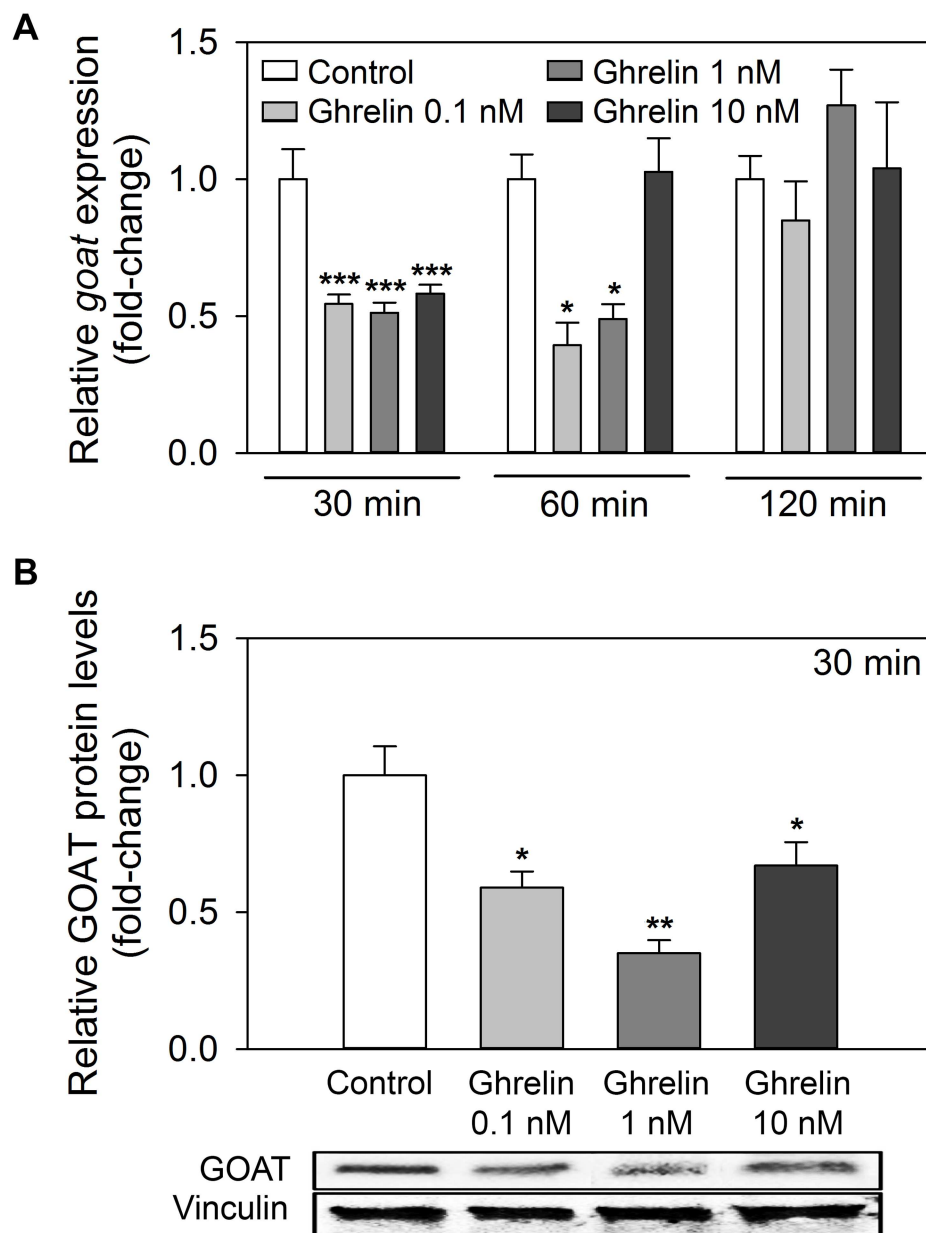


Fig 8. Effects of exposure of intestinal fragments to acylated ghrelin on GOAT mRNA and protein levels. (A) Concentration-response curves for *goat* mRNA expression in goldfish cultured intestine treated with goldfish acylated ghrelin (0.1, 1 and 10 nM) during 30, 60 and 120 min. Data are shown as mean + SEM ($n = 6$). Asterisks denote statistical differences between control and treated groups assessed by ANOVA and post-hoc SNK test (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (B) Concentration-response curves for GOAT protein levels in goldfish cultured intestine treated with goldfish acylated ghrelin (0.1, 1 and 10 nM) during 30 min. Bands density was quantified from three blots and normalized to the density of vinculin protein. Resulting data is plotted as mean + SEM in the upper part of the figure. Asterisks denote statistical differences between control and treated groups assessed by ANOVA and post-hoc SNK test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). The lower part show representative blots from one goldfish.

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g008

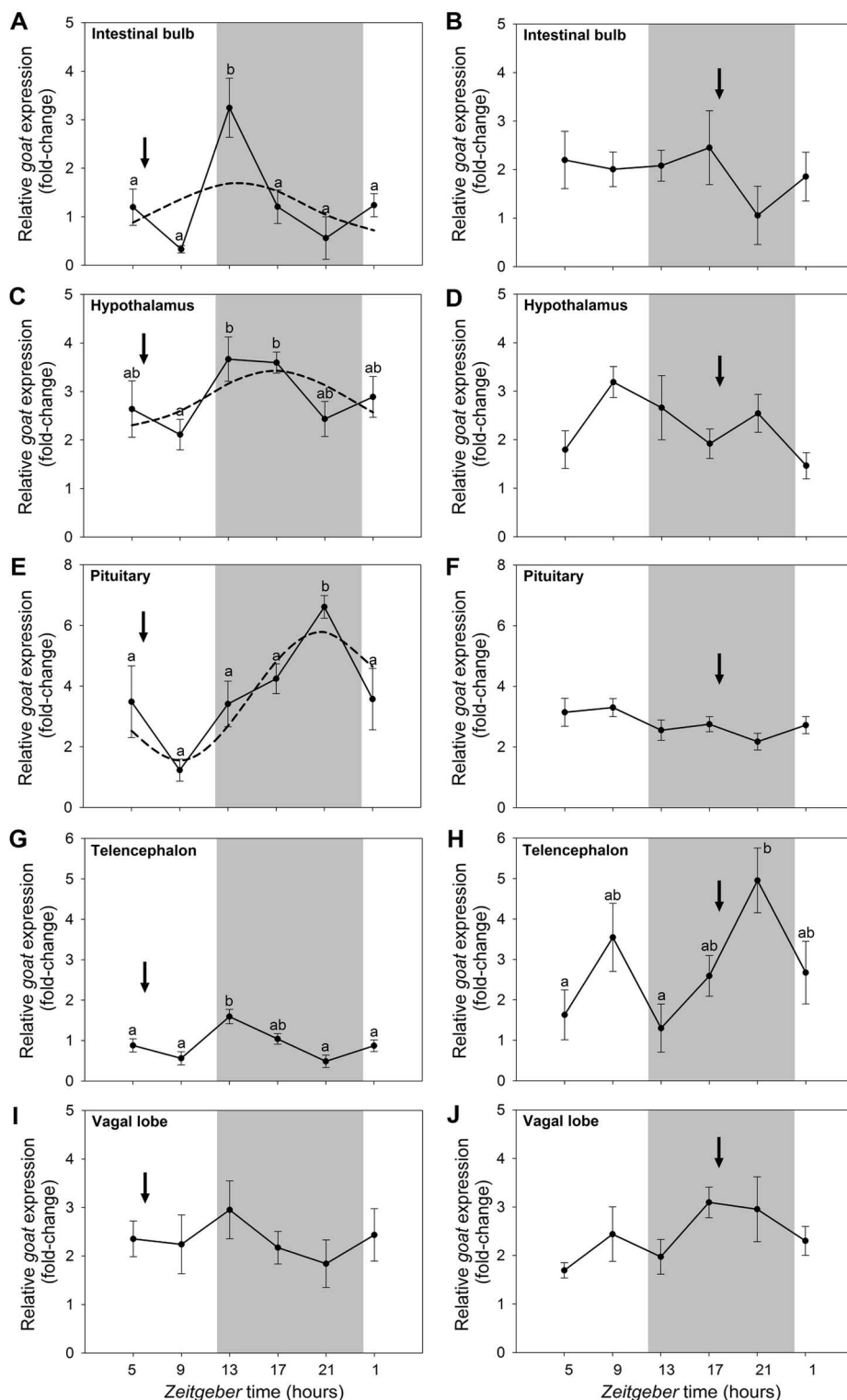


Fig 9. Relative expression of *goat* during a 24-h light/dark cycle in goldfish fed at midday (right panel) or at midnight (left panel). (A and B) Telencephalon, (C and D) Hypothalamus, (E and F) Vagal lobe, (G and H) Pituitary, and (I and J) Intestinal bulb. Relative mRNA amounts were quantified by RT-qPCR. Data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$ /time point). The grey area indicates the dark phase of the daily photocycle, and the arrow indicates the scheduled feeding time (ZT-6 or ZT-18). Dashed lines represent the periodic sinusoidal functions determined by the cosinor analysis when a significant rhythm was detected. Different letters indicate significant differences by ANOVA and post-hoc SNK test ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0171874.g009

Table 2. Parameters defining the expression rhythms of *goat* in goldfish central and peripheral tissues.

	12L:12D, feeding ZT-6		
	Mesor	Amplitude	Acrophase
<i>Hypothalamus</i>	2.9 ± 0.2	0.6 ± 0.2 <i>[0.05, 1.15]</i>	16.9 ± 1.8
<i>Pituitary</i>	3.7 ± 0.3	2.1 ± 0.4 <i>[0.98, 3.22]</i>	20.8 ± 0.9
<i>Intestinal bulb</i>	1.2 ± 0.2	0.5 ± 0.1 <i>[0.22, 0.78]</i>	13.8 ± 2.1

The confidence intervals (99%) of the amplitude values are shown in italics inside the square brackets

doi:10.1371/journal.pone.0171874.t002

To the best of our knowledge, this is the first report on a daily rhythmic expression of *goat* in fishes. In a previous study, we reported daily changes in expression of *preproghrelin* and its main receptor, *ghs-r1a*, in goldfish central and peripheral tissues [15]. Present data show that the daily expression pattern of *goat* observed in hypothalamus and pituitary of goldfish fed at midday clearly matches the one reported for *preproghrelin* and *ghs-r1a* in goldfish maintained under similar conditions of photoperiod and feeding. This similar daily expression pattern in *preproghrelin*, *ghs-r1a* and *goat* points towards a coordinated function of the ghrelinergic system in such locations, and supports the importance of GOAT for ghrelin activation and functioning. In the intestinal bulb, the rhythm of *goat* transcripts is also similar to the one described for *preproghrelin* in the anterior intestine of the same species [15], but its acrophase is 2.5-h advanced compared to *preproghrelin* expression. This lag might support that GOAT is likely acylating other substrates, apart from ghrelin, in the gastrointestinal tract. The existence of a rhythmic expression of all the components of the ghrelinergic system (ghrelin, GOAT and its main receptor) indicates that this system may be acting as an output of the circadian system in goldfish. Besides, the modulation of clock genes expression by ghrelin in goldfish tissues both *in vivo* [12] and *in vitro* [14] points to the ghrelinergic system as an input signal for the circadian system in fish.

The fact that the daily rhythms observed for *goat* mRNA levels in goldfish fed during the photophase are not displayed when food was delivered during the scotophase clearly indicates that the time of feeding is a critical external factor for the 24-h rhythmic expression of *goat* transcripts. Thus, in both central and peripheral tissues, such rhythmicity highly depends on whether feeding takes place during the light phase or the dark phase of the photocycle. Previous reports have described changes in plasma GOAT linked to feeding with a marked preprandial increase [35]. In terms of gene expression, periprandial changes in hypothalamus and gut are not so consistent in fish, but it seems that the lack of a meal increases *goat* expression in these locations [22,35], supporting the relevance of feeding in the daily profile of *goat* expression in two locations related to food intake regulation. In support of this relationship between feeding time and daily rhythm of *goat*, a previous report in mice has shown that *goat* exhibits a daily expression profile in stomach with a diurnal acrophase. Considering that these mice had free access to chow but showed a clear nocturnal food intake pattern, the peak of *goat* expression during the photophase in these mice is in accordance with our observations. In our study, fish also showed a food ingestion pattern according to food availability, but feeding time was not able to synchronize daily pattern of *goat* in goldfish brain and gut, although it is a potent synchronizer of key elements of the circadian system, such as some clock genes (own observations). Thus, it is possible that many other external cues may play key roles in the synchronization of daily profile of *goat* expression.

It is worthy to highlight that the rhythmic expression of *goat* is tissue-dependent, as such rhythms were observed in hypothalamus, intestinal bulb and pituitary, but not in telencephalon and vagal lobe. The existence of rhythmic profiles in hypothalamus and intestinal bulb, key regulators involved in food intake control, supports the important role of the ghrelinergic system as appetite regulator. This is in accordance with the anatomical observations on GOAT being expressed in the same brain areas as other feeding regulators, such as NPY and orexin [50], and on *ghs-r1a* being highly expressed in hypothalamic nuclei related to food intake regulation [15]. Concerning the pituitary, present results represent the first report for a rhythmic expression of *goat* in this gland in any vertebrate. The high expression of *goat* found in this master gland, together with the robust daily expression rhythms of *preproghrelin*, *goat* and *ghs-r1* in this tissue, emphasizes the relevance of the ghrelinergic system in the pituitary. The physiological importance of such observation is yet to be investigated, but it might be related with a circadian regulation of the actions of the ghrelinergic system in this gland (modulatory effect on the secretion of growth hormone), and with the role of ghrelin in reproductive functions [48, 49], also supported by the high expression of *goat* mRNAs in gonads. Together, present results suggest the existence of a circadian regulation of the acylating process of ghrelin in tissues importantly involved in physiological actions known to be regulated by ghrelin.

Conclusions

The present study identifies the full-length sequence of goldfish ghrelin O-acyltransferase, revealing that this teleost has at least two highly homologous cDNAs, named goldfish *goat-V1* and *goat-V2*, encoding this enzyme. These two forms of *goat* would be generated by the transcription of three exons, the first of which differs from the exon 1 that is commonly transcribed in the rest of vertebrates and which we are referred to as exon 1'. Besides the fact that exon 1' and not the typical exon 1 is to be transcribed in goldfish, *goat-V1* would be transcribed by regular splicing, while *goat-V2* would be generated by alternative 3' splice site selection at exon 2. Results presented here offer novel data on the tissue-specificity and regulatory mechanisms underlying GOAT expression. Thus, we found that ghrelin exerts a negative feedback on both the expression of the gene encoding the enzyme and on the protein levels. Feeding time was also observed to be a key factor regulating *goat* mRNA levels, as a rhythmic expression was found in hypothalamus, pituitary and intestinal bulb when fish were fed at midday, but not when they were fed at midnight. The fact that GOAT might be synthesized in a rhythmically manner in the intestinal bulb, together with the observation that this enzyme colocalizes its main substrate ghrelin in enteroendocrine cells, might indicate an important local regulation of ghrelin activation. Collectively, data presented in this work offer novel data on the characterization of GOAT in a non-mammalian vertebrate and represent an important step in the understanding of the activation of ghrelinergic system in fish.

Supporting information

S1 Fig. Exon-intron structure of the *goat* gene in representative teleosts from the Cyprinidae family: the zebrafish (*Danio rerio*), the horned golden-line barbel (*Sinocyclocheilus rhinoceros*) and the common carp (*Cyprinus carpio*), and the proposed structure for goldfish (*Carassius auratus*). Exons are indicated by boxes and introns by lines. The length (pb) of exons and introns is indicated inside the boxes (exons) or above lines (introns). (JPG)

S2 Fig. Alignment of the beginning of the nucleotide sequences of *goat* from various cyprinids to show the high degree of conservation of the exon 1'. Multiple sequence alignment

was conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. The main part of intron 1', exon 1 and intron 1 was omitted for a better comprehension of figure; this is indicated by suspension points (...). Dashed lines represent voids introduced to optimize the alignment. Identical nucleotides among sequences are colored. GT/AG indicates the putative donor/acceptor sites for splicing, and ①② the start codons (ATG) for goldfish transcripts. The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species names and GenBank accession numbers of genomic sequences are as follows: common carp, *Cyprinus carpio*, (1) LHQP01003245.1(80257–80106...78407–78390) and (2) LHQP01015814.1(57963–58120...64869–64886); horned golden-line barbel, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, (1) NW_015642610.1(2326737–2326895...2328839–2328856) and (2) NW_015656585.1(648128–647968...641970–641953); zebrafish, *Danio rerio*, CABZ01049031.1(6992–7150...18211–18228). Sequences for goldfish, *Carassius auratus*, are from cDNA: (V1) KX953158, (V2) KX953159 and (V3) GBZM01002161.1(1008–800). (TIF)

S3 Fig. Alignment of the nucleotide sequences of the exon 1 of goat from various cyprinids. Multiple sequence alignment was conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. Dashed lines represent voids introduced to optimize the alignment. Identical nucleotides among sequences are colored. The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species names and GenBank accession numbers of genomic sequences are as follows: common carp, *Cyprinus carpio*, (1) LHQP01003245.1(78599–78478) and (2) LHQP01015814.1(64651–64772); horned golden-line barbel, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, (1) NW_015642610.1(2328647–2328768) and (2) NW_015656585.1(642129–642068); zebrafish, *Danio rerio*, CABZ01049031.1(18010–18134). (TIF)

S4 Fig. Alignment of the amino acid sequences of GOAT from various vertebrates used to create the phylogenetic tree shown in Fig 4. Multiple sequence alignment was conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. Dashed lines represent voids introduced to optimize the alignment. Identical amino acids among sequences are colored. In common carp-2 GOAT: Δ_n , indicates frameshift deletion; n, number of bases deleted; X, nonsense mutation. When nucleotide sequences are used, they were translated into amino acids using Wise2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>). The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species names and GenBank accession numbers are as follows: alligator, *Alligator sinensis*, XP_006035341.1; Asian arowana, *Scleropages formosus*, JARO02002481.1(36315–36436...36746–36978...37427–38368); Atlantic herring, *Clupea harengus*, JZKK01021833.1(58124–58006...52933–52709...50211–49272); Atlantic salmon, *Salmo salar*, XP_014016526.1; channel catfish, *Ictalurus punctatus*, XP_017306886.1; chimpanzee, *Pan troglodytes*, ENSPTRT00000037288; cock, *Gallus gallus*, NP_001186218.1; coelacanth, *Latimeria chalumnae*, BK009986; common carp, *Cyprinus carpio*, (1) LHQP01003245.1(78599–78478...78401–78176...78096–77163) and (2) LHQP01015814.1(64651–64772...64875–65084...65162–65417...67215–67900); damselfish, *Stegastes partitus*, XP_008292386.1; elephant shark, *Callorhynchus milii*, BK009985; frog, *Xenopus tropicalis*, XP_002936505.2; goldfish, *Carassius auratus*, (V1) APD26025 and (V2) APD26026; horned golden-line barbel, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, (1) XP_016428796.1 and (2) XP_016383356.1; human, *Homo sapiens*, ACB05873.2; Japanese eel, *Anguilla japonica*, AVPY01018663.1(5671–5450...5379–5155...4515–3518); lizard, *Anolis carolinensis*, XP_003224702.1; Mexican

cavefish, *Astyanax mexicanus*, XP_007253942.1; mouse, *Mus musculus*, ACB05874.1; rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, ENSOCUT00000014851; rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, CDQ71181.1; rat, *Rattus norvegicus*, ACB05875.1; red pirahna, *Pygocentrus nattereri*, MAUM01004312.1 (861–985...1063–1287...2692–3625); spotted gar, *Lepisosteus oculatus*, BK009987; stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, AANH01001771.1 (95917–95796...95445–95215...95100–94149); striped bass, *Morone saxatilis*, JTCL01001059.1(43688–43809...44568–44792...45768–46719); tilapia, *Oreochromis niloticus*, AERX01036891.2 (7728–7607...6577–6353...4935–3987); wild boar, *Sus scrofa*, ADI55170.1; yellow croacker, *Larimichthys crocea*, XP_010729215.1; yellowbelly rockcod, *Notothenia coriiceps*, AZAD01045919.1(5788–5667...5115–4891...4240–3295); zebra mbuna, *Maylandia zebra*, XP_014262684.1; zebrafish, *Danio rerio*, ACB05876.1.

(PDF)

S5 Fig. Representative original uncropped Western blot corresponding to the bands shown in Fig 8. Blot shows GOAT levels in goldfish intestinal fragments exposed (or not, control) to different concentrations of goldfish acylated ghrelin during 30 min. Molecular size marker is shown in the left lane, and weights of each protein band (in kDa) is indicated. The goldfish GOAT has a molecular weight of around 45 and 42 kDa (GOAT-V1 and GOAT-V2, respectively).

(TIF)

Author contributions

Conceptualization: AMB MGB ALAG SU MJD AIV.

Formal analysis: AMB MGB ALAG RY SU MJD AIV.

Funding acquisition: MJD SU.

Investigation: AMB MGB RY.

Methodology: AMB MGB ALAG SU MJD AIV.

Resources: MJD SU.

Supervision: ALAG SU MJD AIV.

Visualization: AMB MGB ALAG RY SU MJD AIV.

Writing – original draft: AMB MGB ALAG SU MJD AIV.

Writing – review & editing: AMB MGB ALAG SU MJD AIV.

References

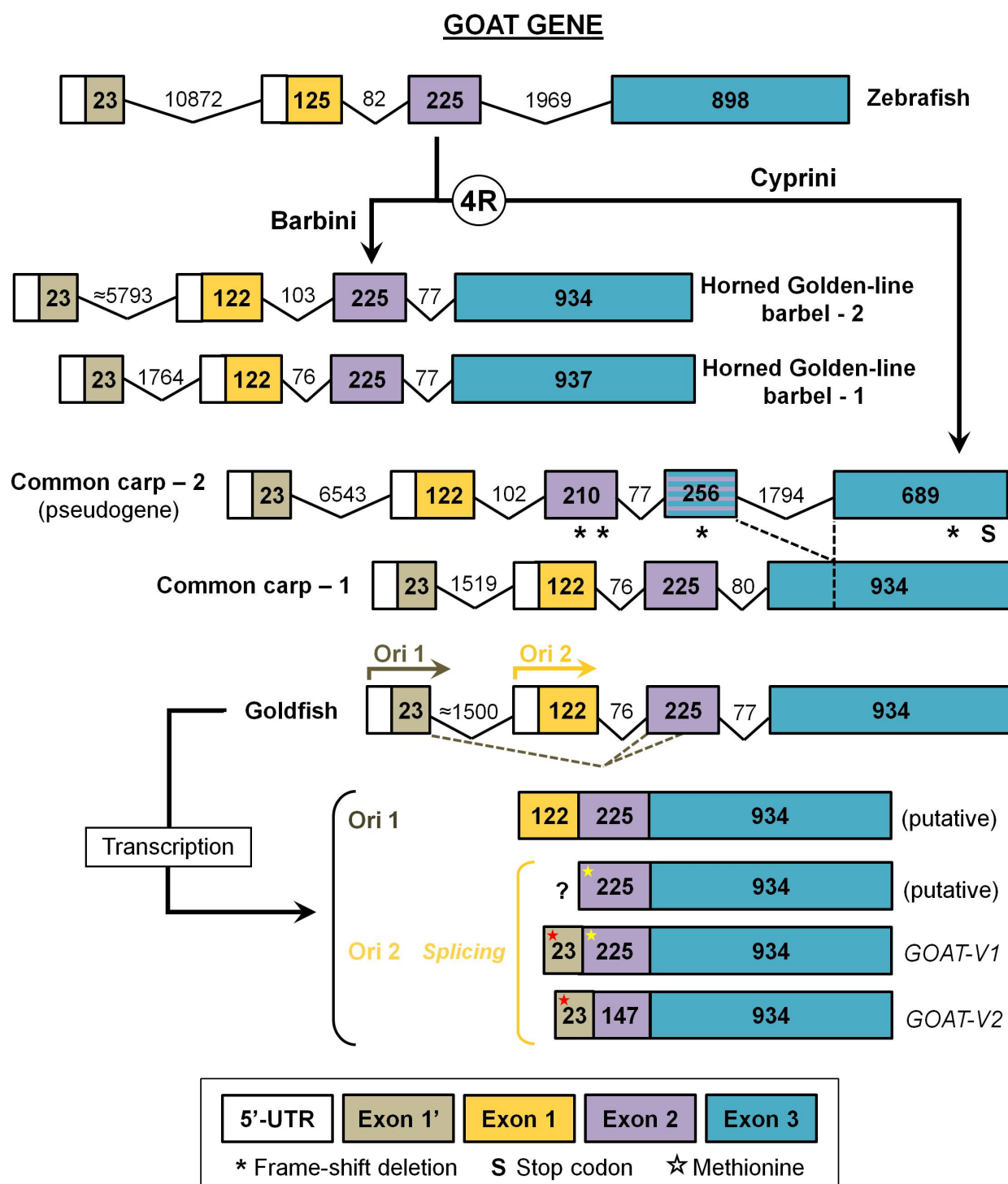
1. Chang S-C, Magee AI. Acyltransferases for secreted signalling proteins (Review). *Mol Membr Biol*. 2009; 26: 104–113. doi: [10.1080/09687680802706432](https://doi.org/10.1080/09687680802706432) PMID: [19169935](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19169935/)
2. Gahete MD, Rincon-Fernandez D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibanez-Costa A, Martinez-Fuentes AJ, et al. Ghrelin gene products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. *J Endocrinol*. 2013; 220: R1–R24. doi: [10.1530/JOE-13-0391](https://doi.org/10.1530/JOE-13-0391) PMID: [24194510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24194510/)
3. Khatib MN. Ghrelin O-acyl transferase (GOAT) as a novel metabolic regulatory enzyme. *J Clin Diagn Res*. 2015.
4. Mohan H, Unniappan S. Discovery of ghrelin o-acyltransferase. *Endocr Dev*. 2013; 25: 16–24. doi: [10.1159/000346039](https://doi.org/10.1159/000346039) PMID: [23652388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23652388/)
5. Shlimun A, Unniappan S. Ghrelin O-acyl transferase: bridging ghrelin and energy homeostasis. *Int J Pept*. 2011; 2011: 1–5.

6. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. 1999; 402: 656–660. doi: [10.1038/45230](https://doi.org/10.1038/45230) PMID: [10604470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10604470/)
7. Delporte C. Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica*. 2013; 2013: 1–25.
8. Heppner KM, Tong J, Kirchner H, Nass R, Tschöp MH. The ghrelin O-acyltransferase—ghrelin system: a novel regulator of glucose metabolism: *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2011; 18: 50–55. doi: [10.1097/MED.0b013e328341e1d3](https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328341e1d3) PMID: [21150588](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21150588/)
9. Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M. What is the general action of ghrelin for vertebrates?—Comparisons of ghrelin's effects across vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*. 2013; 181: 187–191. doi: [10.1016/j.ygcen.2012.10.015](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.10.015) PMID: [23178701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23178701/)
10. Lim CT, Kola B, Korbonits M. The ghrelin/GOAT/GHS-R system and energy metabolism. *Rev Endocr Metab Disord*. 2011; 12: 173–186. doi: [10.1007/s11154-011-9169-1](https://doi.org/10.1007/s11154-011-9169-1) PMID: [21340583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21340583/)
11. Sato T, Nakamura Y, Shimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem (Tokyo)*. 2012; 151: 119–128.
12. Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E. Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen Comp Endocrinol*. 2014; 205: 287–295. doi: [10.1016/j.ygcen.2014.03.016](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.03.016) PMID: [24681192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681192/)
13. Yannielli PC, Molyneux PC, Harrington ME, Golombek DA. Ghrelin effects on the circadian system of mice. *J Neurosci*. 2007; 27: 2890–2895. doi: [10.1523/JNEUROSCI.3913-06.2007](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3913-06.2007) PMID: [17360911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360911/)
14. Sánchez-Bretaña A, Blanco AM, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Kah O, Isorna E. Ghrelin induces clock gene expression in the liver of goldfish *in vitro* via protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Exp Biol*. 2017; pii: jeb. 144253.
15. Sánchez-Bretaña A, Blanco AM, Unniappan S, Kah O, Gueguen M-M, Bertucci JI, et al. *In situ* localization and rhythmic expression of ghrelin and ghs-r1 ghrelin receptor in the brain and gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*). *PLOS ONE*. 2015; 10: e0141043. doi: [10.1371/journal.pone.0141043](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141043) PMID: [26506093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26506093/)
16. Delhanty PJ, Neggers SJ, van der Lely AJ. Des-acyl ghrelin: a metabolically active peptide. *Endocr Dev*. 2013; 25: 112–121. doi: [10.1159/000346059](https://doi.org/10.1159/000346059) PMID: [23652397](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23652397/)
17. Lear PV, Iglesias MJ, Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, Mosquera-Leal A, García-Rúa V, et al. Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology*. 2010; 151: 3286–3298. doi: [10.1210/en.2009-1205](https://doi.org/10.1210/en.2009-1205) PMID: [20410201](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20410201/)
18. Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S-I, Uchiyama M, et al. Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides*. 2006; 27: 2321–2325. doi: [10.1016/j.peptides.2006.03.028](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.028) PMID: [16687192](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16687192/)
19. Gutierrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, et al. Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 6320–6325. doi: [10.1073/pnas.0800708105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800708105) PMID: [18443287](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18443287/)
20. Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell*. 2008; 132: 387–396. doi: [10.1016/j.cell.2008.01.017](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.017) PMID: [18267071](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267071/)
21. Taylor MS, Dempsey DR, Hwang Y, Chen Z, Chu N, Boeke JD, et al. Mechanistic analysis of ghrelin-O-acyltransferase using substrate analogs. *Bioorganic Chem*. 2015; 62: 64–73.
22. Hatf A, Yufa R, Unniappan S. Ghrelin O-acyl transferase in zebrafish is an evolutionarily conserved peptide upregulated during calorie restriction. *Zebrafish*. 2015.
23. Taylor MS, Ruch TR, Hsiao P-Y, Hwang Y, Zhang P, Dai L, et al. Architectural organization of the metabolic regulatory enzyme ghrelin O-acyltransferase. *J Biol Chem*. 2013; 288: 32211–32228. doi: [10.1074/jbc.M113.510313](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510313) PMID: [24045953](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24045953/)
24. Romero A, Kirchner H, Heppner K, Pfluger PT, Tschöp MH, Nogueiras R. GOAT: the master switch for the ghrelin system? *Eur J Endocrinol*. 2010; 163: 1–8. doi: [10.1530/EJE-10-0099](https://doi.org/10.1530/EJE-10-0099) PMID: [20421334](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20421334/)
25. Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, et al. Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 386: 153–158. doi: [10.1016/j.bbrc.2009.06.001](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.001) PMID: [19501572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19501572/)
26. Satou M, Nishi Y, Yoh J, Hattori Y, Sugimoto H. Identification and characterization of acyl-protein thioesterase 1/lysophospholipase I as a ghrelin deacylation/lysophospholipid hydrolyzing enzyme in fetal bovine serum and conditioned medium. *Endocrinology*. 2010; 151: 4765–4775. doi: [10.1210/en.2010-0412](https://doi.org/10.1210/en.2010-0412) PMID: [20685872](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20685872/)
27. An W, Li Y, Xu G, Zhao J, Xiang X, Ding L, et al. Modulation of ghrelin O-acyltransferase expression in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2010; 26: 707–716.

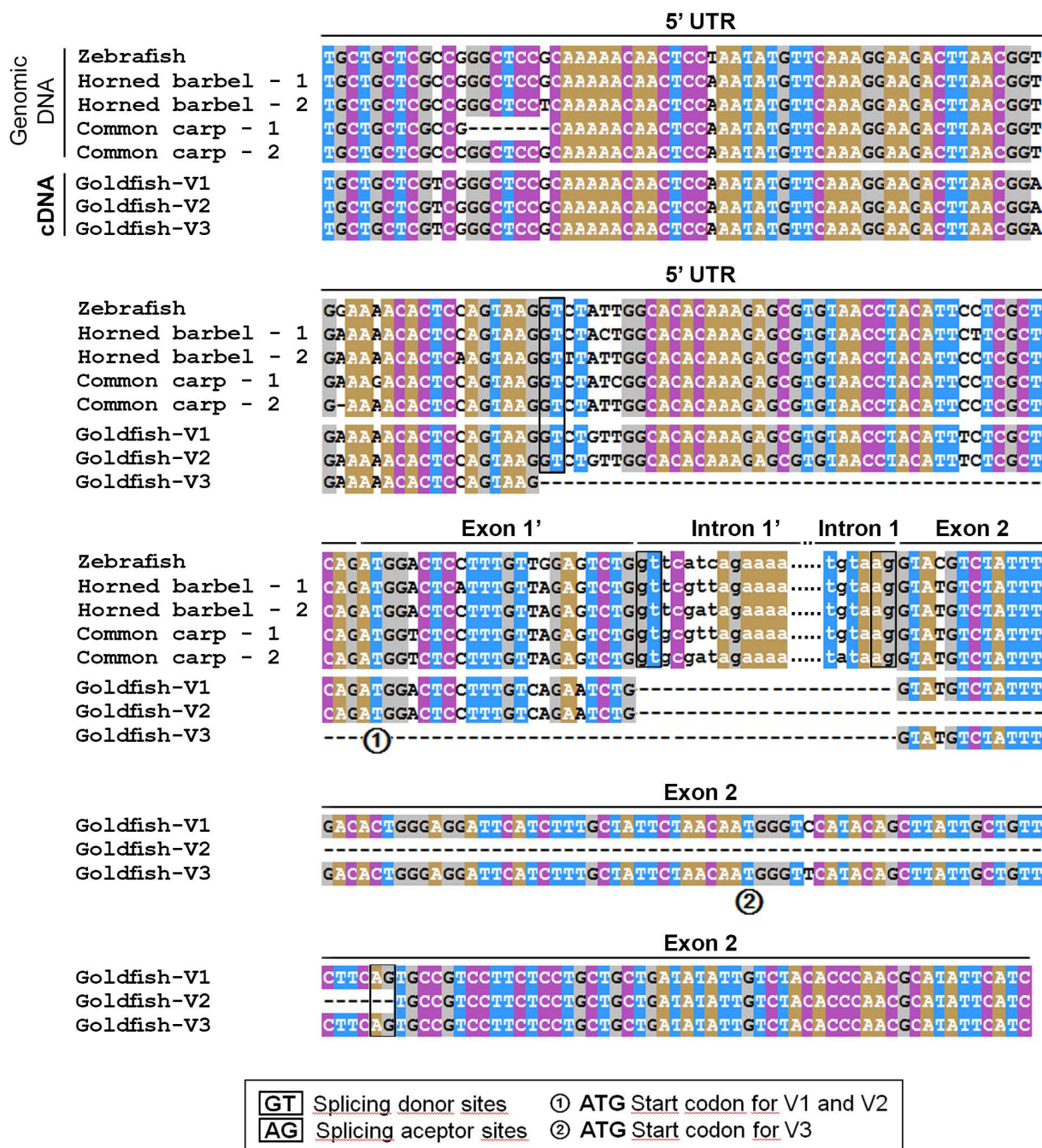
28. Sakata I, Yang J, Lee CE, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Elmquist JK, et al. Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *AJP Endocrinol Metab*. 2009; 297: E134–E141.
29. Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NWG. Differential distribution of ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) immunoreactive cells in the mouse and rat gastric oxyntic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 392: 67–71. doi: [10.1016/j.bbrc.2009.12.169](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.12.169) PMID: [20059966](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20059966/)
30. Lim CT, Kola B, Grossman A, Korbonits M. The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocr J*. 2011; 58: 707–710. PMID: [21646729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21646729/)
31. Gómez R, Lago F, Gómez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Expression and modulation of ghrelin O-acyltransferase in cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 2009; 60: 1704–1709. doi: [10.1002/art.24522](https://doi.org/10.1002/art.24522) PMID: [19479831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19479831/)
32. Gonzalez CR, Vazquez MJ, Lopez M, Dieguez C. Influence of chronic undernutrition and leptin on GOAT mRNA levels in rat stomach mucosa. *J Mol Endocrinol*. 2008; 41: 415–421. doi: [10.1677/JME-08-0102](https://doi.org/10.1677/JME-08-0102) PMID: [18835978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18835978/)
33. Shin Y-K, Martin B, Kim W, White CM, Ji S, Sun Y, et al. Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsivity to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants. *PLoS One*. 2010; 5: e12729. doi: [10.1371/journal.pone.0012729](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012729) PMID: [20856820](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20856820/)
34. Isorna E, de Pedro N, Valenciano AI, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ. Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. *J Endocrinol*. 2017; 232: R141–R159. doi: [10.1530/JOE-16-0330](https://doi.org/10.1530/JOE-16-0330) PMID: [27999088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27999088/)
35. Blanco AM, Gómez-Boronat M, Redondo I, Valenciano AI, Delgado MJ. Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Physiol [B]*. 2016; 186: 727–738.
36. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013; 30: 2725–2729. doi: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197) PMID: [24132122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24132122/)
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} method. *Methods San Diego Calif*. 2001; 25: 402–408.
38. Sánchez-Bretaña A, Callejo M, Montero M, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Isorna E. Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce *gper1a* and *gper1b* expression and repress *gclock1a* and *gbmal1a* in the liver of goldfish. *J Comp Physiol [B]*. 2016; 186: 73–82.
39. Delgado MJ, Alonso-Gómez AL, Gancedo B, de Pedro N, Valenciano AI, Alonso-Bedate M. Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. *Gen Comp Endocrinol*. 1993; 92: 143–150. PMID: [8282167](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8282167/)
40. Koukkari WL, Sothorn RB. Chronobiometry: analyzing for rhythms. Springer Netherlands; 2006. p. pp 577–602.
41. Larhammar D, Risinger C. Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol Phylogenet Evol*. 1994; 3: 59–68. doi: [10.1006/mpev.1994.1007](https://doi.org/10.1006/mpev.1994.1007) PMID: [8025730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8025730/)
42. Shen H, Chou JJ. MemBrain: improving the accuracy of predicting transmembrane helices. Kobe B, editor. *PLoS ONE*. 2008; 3: e2399. doi: [10.1371/journal.pone.0002399](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002399) PMID: [18545655](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18545655/)
43. Yang J, Jang R, Zhang Y, Shen H-B. High-accuracy prediction of transmembrane inter-helix contacts and application to GPCR 3D structure modeling. *Bioinforma Oxf Engl*. 2013; 29: 2579–2587.
44. Nugent T, Jones DT. Detecting pore-lining regions in transmembrane protein sequences. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13: 169. doi: [10.1186/1471-2105-13-169](https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-169) PMID: [22805427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22805427/)
45. Pagac M, de la Mora HV, Duperrex C, Roubaty C, Vionnet C, Conzelmann A. Topology of 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferases SLC1 and ALE1 and related membrane-bound O-acyltransferases (MBOATs) of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2011; 286: 36438–36447. doi: [10.1074/jbc.M111.256511](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.256511) PMID: [21849510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21849510/)
46. Chang T-Y, Li B-L, Chang CCY, Urano Y. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009; 297: E1–9. doi: [10.1152/ajpendo.90926.2008](https://doi.org/10.1152/ajpendo.90926.2008) PMID: [19141679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19141679/)
47. Jönsson E. The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2013; 187: 79–85. doi: [10.1016/j.ygcen.2013.03.013](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.03.013) PMID: [23557643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23557643/)
48. Unniappan S. Ghrelin: an emerging player in the regulation of reproduction in non-mammalian vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*. 2010; 167: 340–343. doi: [10.1016/j.ygcen.2009.12.003](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.12.003) PMID: [20005227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20005227/)
49. Unniappan S, Peter RE. *In vitro* and *in vivo* effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286: R1093–1101. doi: [10.1152/ajpregu.00669.2003](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00669.2003) PMID: [15001435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15001435/)

50. Blanco AM, Sánchez-Bretaña A, Delgado MJ, Valenciano AI. Brain mapping of ghrelin O-acyltransferase in goldfish (*Carassius auratus*): novel roles for the ghrelinergic system in fish? *Anat Rec*. 2016; 299: 748–758.
51. Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2004; 55: 137–154.
52. Kitazawa T, Itoh K, Yaosaka N, Maruyama K, Matsuda K, Teraoka H, et al. Ghrelin does not affect gastrointestinal contractility in rainbow trout and goldfish in vitro. *Gen Comp Endocrinol*. 2012; 178: 539–545. doi: [10.1016/j.ygcen.2012.06.025](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.06.025) PMID: [22776445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22776445/)
53. Yang J, Zhao T-J, Goldstein JL, Brown MS. Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105: 10750–10755. doi: [10.1073/pnas.0805353105](https://doi.org/10.1073/pnas.0805353105) PMID: [18669668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18669668/)

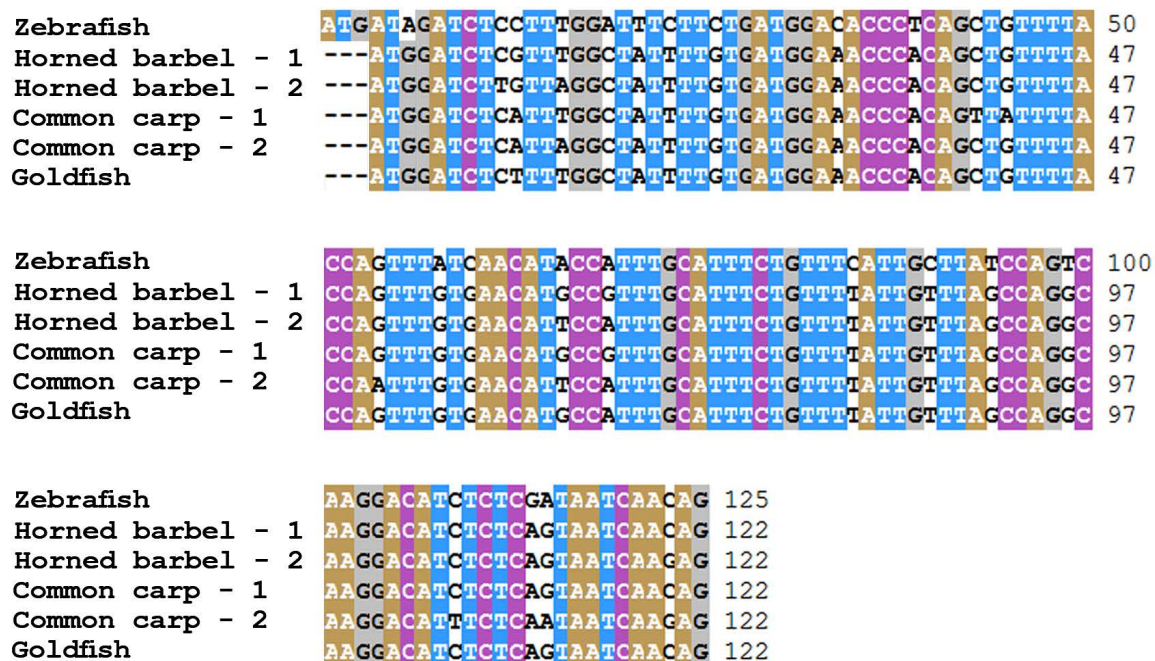
Supplementary information



S1 Fig. Exon-intron structure of the goat gene in representative teleosts from the Cyprinidae family: the zebrafish (*Danio rerio*), the horned golden-line barbel (*Sinocyclocheilus rhinoceros*) and the common carp (*Cyprinus carpio*), and the proposed structure for goldfish (*Carassius auratus*). Exons are indicated by boxes and introns by lines. The length (pb) of exons and introns is indicated inside the boxes (exons) or above lines (introns).



S2 Fig. Alignment of the beginning of the nucleotide sequences of goat from various cyprinids to show the high degree of conservation of the exon 1'. Multiple sequence alignment was conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. The main part of intron 1', exon 1 and intron 1 was omitted for a better comprehension of figure; this is indicated by suspension points (...). Dashed lines represent voids introduced to optimize the alignment. Identical nucleotides among sequences are colored. GT/AG indicates the putative donor/acceptor sites for splicing, and ①② the start codons (ATG) for goldfish transcripts. The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species names and GenBank accession numbers of genomic sequences are as follows: common carp, *Cyprinus carpio*, (1) LHQP01003245.1(80257–80106....78407–78390) and (2) LHQP01015814.1(57963–58120....64869–64886); horned golden-line barbel, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, (1) NW_015642610.1(2326737–2326895...2328839–2328856) and (2) NW_015656585.1(648128–647968....641970–641953); zebrafish, *Danio rerio*, CABZ01049031.1(6992–7150...18211–18228). Sequences for goldfish, *Carassius auratus*, are from cDNA: (V1) KX953158, (V2) KX953159 and (V3) GBZM01002161.1(1008–800).



S3 Fig. Alignment of the nucleotide sequences of the exon 1 of goat from various cyprinids. Multiple sequence alignment was conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. Dashed lines represent voids introduced to optimize the alignment. Identical nucleotides among sequences are colored. The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species names and GenBank accession numbers of genomic sequences are as follows: common carp, *Cyprinus carpio*, (1) LHQP01003245.1(78599–78478) and (2) LHQP01015814.1(64651–64772); horned golden-line barbel, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, (1) NW_015642610.1(2328647–2328768) and (2) NW_015656585.1(642129–642068); zebrafish, *Danio rerio*, CABZ01049031.1(18010–18134).

S4 Fig. Alignment of the amino acid sequences of GOAT from various vertebrates used to create the phylogenetic tree shown in Fig 4. Multiple sequence alignment was conducted using Clustal W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor. Dashed lines represent voids introduced to optimize the alignment. Identical amino acids among sequences are colored. In common carp-2 GOAT: Δn, indicates frameshift deletion; n, number of bases deleted; X, nonsense mutation. When nucleotide sequences are used, they were translated into amino acids using Wise2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/genewise/>). The common name of the species used for the alignment is given on the right side, and the species names and GenBank accession numbers are as follows: alligator, *Alligator sinensis*, XP_006035341.1; Asian arowana, *Scleropages formosus*, JARO02002481.1(36315–36436...36746–36978...37427–38368); Atlantic herring, *Clupea harengus*, XP_002936505.2; goldfish, *Carassius auratus*, (V1) APD26025 and (V2) APD26026; horned golden-line barbel, *Sinocyclocheilus rhinoceros*, (1) XP_016428796.1 and (2) XP_016383356.1; human, *Homo sapiens*, ACB05873.2; Japanese eel, *Anguilla japonica*, AVPY01018663.1(5671–5450...5379–5155...4515–3518); lizard, *Anolis carolinensis*, XP_003224702.1; Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*, XP_007253942.1; mouse, *Mus musculus*, ACB05874.1; rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, ENSOCUT00000014851; rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, CDQ71181.1; rat, *Rattus norvegicus*, ACB05875.1; red piranha, *Pygocentrus nattereri*, MAUM01004312.1 (861–985...1063–1287...2692–3625); spotted gar, *Lepisosteus oculatus*, BK009987; stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, AANH01001771.1 (95917–95796...95445–95215...95100–94149); striped bass, *Morone saxatilis*, JTCL01001059.1(43688–43809...44568–44792...45768–46719); tilapia, *Oreochromis niloticus*, AERX01036891.2(7728–7607...6577–6353...4935–3987); wild boar, *Sus scrofa*, ADI55170.1; yellow croaker, *Larimichthys crocea*, XP_010729215.1; yellowbelly rockcod, *Notothenia coriiceps*, AZAD01045919.1(5788–5667...5115–4891...4240–3295); zebra mbuna, *Maylandia zebra*, XP_014262684.1; zebrafish, *Danio rerio*, ACB05876.1.

Exon 1

Exon 2

Channel catfish	--MDLLWMIFNQNQOLAYQLFTIPLAFLFYSLATQGYLTFLNRHICLALGGFIVAILTMGPYSTLLFITFITFVLLVRFM	78
Red piranha	--MDLLWIIFNQNQOLAYQLFTIPFAWLFYSLATRGYLTILINRYMFLTLGGFILAVALTMGPYSILLFITATKFLVLLVHFV	78
Mexican cavefish	--MDFLWNIFNQNQOLAYQFYLIPLALVFYGLTMTGYLTILINRYICLMFGGAILAVLTMGYPYSILLFITATMFVLLVHFV	78
Zebrafish	--MIDLLWISSDGHQPQLFYQFINIPFAFLFYHCLSSQGHLSIINRYVYLMAGGFMIAIATMGYPYSLLFLSAIKLILLIHYI	79
Common carp - 2	--MDLIRLFCDGNPQLFYQFVNMPFAFLFYCLARQGHLSVINRYVYLTGGFILAIVTMGPYSILLFFSAVLLILLIRCL	78
Horned barbel - 2	--MDLVRLFCDGNPQLFYQFVNIPFAFLFYCLARQGHLSVIKRYVYLTGGFILAIVTMGPYSILLFFSAVLLILLIRCL	78
Goldfish-V1	--MDSFVRIW-----YVYLTGGFIFAILTMGYPYSILLFFSAVLLILLIYCL	45
Goldfish-V2	--MDSFVRIC-----AVLLILLIYCL	19
Horned barbel - 1	--MDLVWLFCDGNPQLFYQFVNMPFAFLFYCLARQGHLSVINRYVYLTGGFIFAIVTMGPYSILLFFSAVLLILLIYCL	78
Common carp - 1	--MDLIWLFCDGNPQLFYQFVNMPFAFLFYCLARQGHLSVINRYVYLTGGFIFAIVTMGPYSILLFFSAVLLILLIYCL	78
Spotted gar	--MDLSWCVFDLHPQIVYQFSALPFAFLFYFFTKLKCLSVISRYIYLLGGCVLATVTMGQYCLIVLTPAATFVLLLSV	78
Japanese eel	--MDLKMVFQONSQLIYQFLPFPFALLYYILARQGCLSSSTNRYVYLTGGCVLAMVSMGPYCWLVLPVPGASAVLAPSA	78
Asian arowana	--MDFIRWLFQSPHLLYQFFSIPFALLFYILARLDCITLTHRYVYLMSSGGCVLAAVTMGPYACLLVPFAWVLLFCSL	78
Atlantic herring	--MASIWDFSGSAQLMYQCLSLPFAFLFYCLATNGYLTLTQRYLYLVGGFSLAVISMGWYSILFFSVIMSAIILYYL	77
Atlantic salmon	--MEPIQWLCEQHPFLMYQCFSPFAFLFYVLAKQGCLSLTYRYLFLASGGCILAIVTMGPYSILLVSTVIFVLLVCSL	78
Rainbow trout	--MEPIQWLCEQHPFLTYQCFSPFAFLFYVLAKQGCLSLTYRYLFLASGGCILAIVTMGPYSILLVSTVIFVLLVCSL	78
Stickleback	--MGLMSFWERHQFLMHQCFSLPFAFLFFFLAKRGYLSLTTRYLFLVSAGGCVLAVTMGPYSILLFFASALVLLVSV	78
Zebra mbuna	--MGSIGWSWEQHRFLMYQCLSLPFAFLFYFLAKRGHLSLTTRYLFLVSAGGCVLAVTMGIYSTLLFFSTLAFVLLVCCV	78
Tilapia	--MGSIGWSWEQHRFLMYQCLSLPFAFLFYFLAKRGHLSLTTRYLFLVSAGGCVLAVTMGIYSTLLFFSTLAFVLLVCCV	78
Damselfish	--MGSIGWLWEQHQLLMHQCCSLPFAFLFYFLSKRRYLSLTTRYLFLVSAGGCVLAVTMGIYSTLLFFSTFVFLVLSV	78
Yellowbelly rockcod	--MGLMSSLWEQHQLMHQCFSLPFAFLFYILAKRGYLGTYRYLFLVSAGGCVLAVTMGPYSILLFFSTFVFLVCSV	78
Yellow croaker	--MGLMNLWEHHQFLMHQCFSLPFAFLFYFLAKRGYLSLTTRYLFLVSAGGCVLAVTMGIYSTLLFFSTFVFLVCSV	78
Striped bass	--MGSMNWLWEHHQFLMHQFYFLPFAFLFYFLAKLGFLSLTYRYLFLVAIGGCVLAVTMGIYSTLLFFSTFVFLVCSV	78
Elephant shark	MDLEFLQQLDFYPVTMYQLMSVPLAFMFYQLSIKGHLPALTARYLFLVFGGLVMCMVSMGPYALVLPALSSVMMLHSL	80
Frog	--MDY--LQLVHFVVALYQLAFAFFAFYLYGYSFGHLPITPRFIYLLFGGIVLSCVSMGPYAVVIFIPALGSIVLFHII	76
Coelacanth	--MDLSIVLSYVHPVTIYQLVIPFAVVFYLLCIHGSLSVTARYLFLVGGFLLSNIAIMVIFIPAVLSVIMMHSI	78
Cock	--MR-WADLLILPAAWYQLAFLAFLAFLHYLCALGHLSLTTRYLFLVAGGCLLAGTAMGSYATLLIPAVSSVLMFLV	77
Lizard	--MN-WESPFLFQATAFYQLAALPFAFLFYHLCCTNLSSINSRYIFLLVGGFILAACAIGCYALLVFSVAFCSLATIHS	77
Alligator	--ME-WADPFLNPTILYQMLAFAFAFLHYLCSFGYLSPSARYVLLVGGFILAACAAGLYALLFIPALCSVAIFHSV	77
Wild boar	--MD-WLQFLFLHPVLFYQGAAPFALLFNLCITDSFSTRARYLFLLAGGVALAAMGAFAVLVFPALGAVALIHS	77
Mouse	--MD-WLQFLFLHPLSFYQGAAPFALLFNLCITDFTSTRARYLFLLAGGVALAFAAMGPYSLLIFIPALCAVALVSFL	77
Rat	--MD-WLQFLFLHPVSLYQGAAPFALLFNLCITDFTSTRARYLFLLAGGVALAFAAMGPYALLIFIPALCAVAMISL	77
Chimpanzee	--ME-WLRLFFLHPVSIFYQGAAPFALLFNLCIMDSFSTRARYLFLLAGGVALAAMGSYAVLVFTPAVCAVALCSL	77
Human	--ME-WLWFLFLHPISFYQGAAPFALLFNLCIMDSFSTRARYLFLLAGGVALAAMGSYAVLVFTPAVCAVALCSL	77
Rabbit	--MD-WLQFLFLHPVSLYQGAAPFALLFNLCIWDSSARARYLFLLAGGVALAAMGLYAMLVFTPAVCAVFLVSSL	77

Exon 2

Exon 3

Channel catfish	EPVHIHYWIFGLQMCWQFLWBFYMQYQHYWLOEPDPSFEVILAMLSALMLLSORVTSVSMDLQEGKVIRNFRGSFQ----	152
Red piranha	EPLHVHWILGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPADSRLLILAMLSALMLLSORVTSVSMDLQEGKVAKAFRGSYR----	152
Mexican cavefish	EPVDVHHWIFGLQMCWQFLWBFYMQYQYQYWLOEPADSRLLILAMLSALMLLSORVTSVSMDLQERKVCPRFGRTYQ----	152
Zebrafish	HPMHLHRWILGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPADSRLLILAMLSALMLMTORITSSLDLQEGTISNQ-----	147
Common carp - 2	QQMHLDMV A ₅ LQMCWFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSFEVILAMLSALMLMTORVSSIALA ₈ - QGTVTSPFQNSSR----	146
Horned barbel - 2	HPMHIHYWTGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSR----	152
Goldfish-V1	HPTHIHHTWTLGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	119
Goldfish-V2	HPTHIHHTWTLGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	93
Horned barbel - 1	QPTHIHQWMLGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	152
Common carp - 1	HPTRIHWMTGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	152
Spotted gar	HPQHVFHWGFFVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	153
Japanese eel	RSLHAHTCVFQAQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	158
Asian arowana	RPNWVHPWVLTGLQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	149
Atlantic herring	DSQIHPWIFTVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Atlantic salmon	SPERVHPWVFGLOMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	147
Rainbow trout	SPERVHPWVFGLOMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	147
Stickleback	DAGRVAHWVFGLOMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	153
Zebra mbuna	DHSCIHTWAFVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	150
Tilapia	DHSCIHTWAFVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	150
Damselfish	DPGCVHVWAFVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	153
Yellowbelly rockcod	DLRHVHTWVTFVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	153
Yellow croaker	DSSSIHAWVFSQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	153
Striped bass	DPSSVHIWAFSIOQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	153
Elephant shark	RAMTVHKLIFFTQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	153
Frog	SPQSVHWWALALQVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Coelacanth	SPQSVHWWALALQVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	152
Cock	SPAYVHTWVFSLOMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	145
Lizard	DLQVHVWAFVQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	150
Alligator	SPLRVHTWVVFQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Wild boar	GPRLVHRTFFLFQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Mouse	SPQEVHRTFFLFQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Rat	SPQEVHRTFFLFQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Chimpanzee	APQQVHRWTFQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Human	APQQVHRWTFQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151
Rabbit	SPPEVHRWTFQMCWQFLWBFYQYQYQYWLOEPDPSRLLILAMLSALMLMTORVSSSLDLQEGTITSPFQNSSQ----	151

Exon 3

Channel catfish	-----SQVVCAPFMSYTY--PALIGGPLCPE--NTYVNFVEQISVNRPPSPL-TIL-PW-----KMLQVLLLVLVK	215
Red pirahna	-----SQAISLIPFLSYSLY--PALIGGPLCSE--TTVTFVEQISIRPPPSPL-AIL-PW-----KILRVLVVLVVK	215
Mexican cavefish	-----SKICSLIPFLSYTY--PALIGGPLCPE--KSVAFVEQMGCRTPPSPY-AIV-LW-----KILQVLFLLVLK	215
Zebrafish	-----SIILPFLSYSLY--PALIGGPLCSE--NAFVQSVERQHTSMT--SY-LGNLTSK-----ISQVIVLVWIK	206
Common carp - 2	-----GLSVLIPFLSYSLD--PALIEGPLCSE--NTVESVRQISVTSPLASY-LGRLSKIIFSYSFHLWQVVVLWIK	216
Horned barbel - 2	-----GLSVLIPFLSYSLN--PALIGGPLCSE--NTVESVRQISVTSPLASY-LGRITSK-----MLQVVVLVWIK	215
Goldfish-V1	-----DLSVLIPFLSYSLN--PALIGGPLCSE--NTVQSVRQMSVTPPLTPY-LRRLTSK-----ILQVILVWIK	182
Goldfish-V2	-----DLSVLIPFLSYSLN--PALIGGPLCSE--NTVQSVRQMSVTPPLTPY-LRRLTSK-----ILQVILVWIK	156
Horned barbel - 1	-----DLSILIPFLSYSLN--PALIGGPLCSE--NTVQSVRQMSVTPPLASY-LRRLTSK-----LLQVILVWIK	215
Common carp - 1	-----DLSVLIPFLSYSLN--PALIGGPLCSE--NTVQSVRQMSVTPPLGSY-LRRLTSK-----ILQVILVWIK	215
Spotted gar	-----VRYNFPLWIPYLSYTLF--PALIGGPLCSE--SYRSFVEQNGLSSIPF---PLGAV-----LQKTLVLVLEGA	218
Japanese eel	HLAGTHSVGSATSALQYLSYTY--PGIIGGPLCSE--QQVVSFVEQVRVSP---APQ--PLYAV-----CCKVCWALGLQW	228
Asian arowana	-----AGALPYLSYSLY--PGIIGGPLCSE--SQVRFVEKSGSVPPPPPS-PLRPV-----LLKCLMAFSLWAR	211
Atlantic herring	-----VYSSHLPPFACYSYSLY--VFILGGPLCPE--DQVVSFVQHIQQNPPPS---PLNRV-----SLRLWLVLLEGIK	214
Atlantic salmon	-----IQCRVFLPLISYALN--TALLGGPLSSE--DQVYFVEQITISPPPQ---PLSVI-----SYKGFQVLSLEWAR	210
Rainbow trout	-----TQCRVFLPLISYALN--TALLGGPLSSE--DQVYFVEQTTISPPPQ---PLSVI-----SYKGFQVLSLEWAR	210
Stickleback	-----EARAALLPLVSYILN--TTLLGGPLCPE--GRVSLMTGISADPPE---PLRAV-----FLKLTQVLPMEVLR	216
Zebra mbuna	-----QTCVTLPLISYILN--TTLLGGPLCSE--GQTITLMEGINLTSPPS---PPGVV-----FLKLMQVLMLEWVR	213
Tilapia	-----QACVTLPLISYILN--TTLLGGPLGSY--GQTITLMEGINLTSPPR---PLGVV-----FLKLMQVLMLEWVR	213
Damselfish	-----QSRVMILPLISYSLY--TTLLGGPLCSE--SRVLLMEGLGLSAPPS---PLAVV-----LLKLQVLLLEQVR	216
Yellowbelly rockcod	-----KACVMILPLISYILN--TTLLGGPLCSE--RHFVSLMAGISLHAPPN---PLGVV-----LLKLMQIIMLECVK	216
Yellow croaker	-----NRRVMILPLISYILN--TTMLGGPLCSE--SRVITLMAEIRFNHPPN---PLGVV-----LKLTLQVLLLECLR	216
Striped bass	-----KACVMILPLISYILN--TTLLGGPLCSE--SRVSLMAGIRLNPPPN---PQGVV-----FLKLIQVLLLECLR	216
Elephant shark	----HSSSEFLRCLLPHISYVLY--PALIGGPLCSE--QMQIHMENLKKSQKRNANSIWFF-----LKKCLLVFIMDR	223
Frog	---NWFFSGSAHNILIFLSYLLF--PALIGGPLCSE--VEHHHVTVAPRCNYL---CFKQV-----AKGFFFAILQMLR	218
Coelacanth	---NNSILQYLHNLLPYFSYMIY--PALIGGPLLESL--QLKIHETISGKCTEN---CSLP-V-----TKKFCFLALLELK	220
Cock	-----GLLQRALPLCSYLLF--PALIGGPLCSE--SKQAQVMSLGAVPC---PLRAV-----CWRYLGVVLVQVLR	206
Lizard	---KGPLERHLHQALPVCTYLLS--PTLLGGPLCSE--NRQTWIRCSRRTSFSQ---CSLWAA-----IQKALGALMLGFLK	219
Alligator	---K---EPLLGAFLPFCYLLF--PALIGGPLCSE--KRQAQILCSSLPYFT---QSLWA---GQKSLWALTQLLR	215
Wild boar	---ESSLPKRLWKALPYCSYLLF--PALIGGPLCSE--RRQSHVQGPSRSDPR---HSLWAL---TCQGLQIVGLECLK	219
Mouse	---KSSFSEHLWDALPHFSYLLF--PALIGGSLCSE--RRQACVQRSSSLYPS---ISFRAL---TWRLQIILGLECLK	219
Rat	---RSSLCEHLWDALPYISYLLF--PALIGGSLCSE--RRQACVQRPSRLYPS---ISFWAL---TWRLQIILGLECLK	219
Chimpanzee	---RSSLSEHVCKALPYFSYLLF--PALIGGSLCSE--RRQARVQSSSALHPR---HSFWAL---SWRCLQIILGLECLN	219
Human	---RSSLSEHVCKALPYFSYLLF--PALIGGSLCSE--RRQARVQSSSALHPR---HSFWAL---SWRGLQIILGLECLN	219
Rabbit	---RRSLAEHLGKALPYLSYLLF--PALIGGPLCSE--RRQARVQRSSSLGPK---HCFWVL---SWRGLQIILGLESK	219

Exon 3

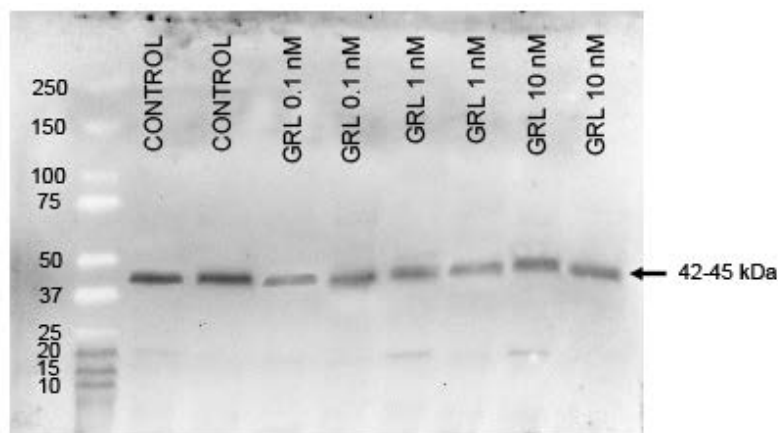
Channel catfish	FLLTGVLQSSIF---SLS---SSPSILWIWIFSLVLRITTYVHFKISECVNNAAGLGFSGYSTTG-GALWNLSDGDFA	287
Red pirahna	YLFSSFLQLSIF---RLSS-PHDSPGILWIWISLVLRINYYAHFKISECLNNAAGLGFSGCGPNG-GTLWDGLSDGDPW	290
Mexican cavefish	YLLSSFLQLSIA---NLSS-SQESPGLLVWVWIFSLVLRINYYTHFKISECVNNAAGLGYCKGCLNG-GELWNLSDGNPL	279
Zebrafish	QLFSELLKSATF---NIDS---VCLDVLWIWIFSLTLRINYYAHFKMSECVNNAAGLGVYFHKHSG-QTSWDELSDGSLV	290
Common carp - 2	YPLKELLKSITF---TVNS-PCICQNIWIWVLSLLKKNYYAHFKVSECVNNAAGMGFHYSHSG-KSSWDGFSGSPW	291
Horned barbel - 2	YPLKELLKSITF---TVNS-PCVCQNIWIWVLSLLKKNYYAHFKLSECVNNAAGMGFHYSHSG-KSSWDGFSGSPW	290
Goldfish-V1	YPLKELLKSITF---RVNS-PCVCQNIWIWVLSLLKKNYYAHFKVSECVNNAAGIGFHYSHSG-KKSWDGFSDGSPW	257
Goldfish-V2	YPLKELLKSITF---RVNS-PCVCQNIWIWVLSLLKKNYYAHFKVSECVNNAAGIGFHYSHSG-KKSWDGFSDGSPW	231
Horned barbel - 1	YPLKELLKSITF---RVNS-PCVCQNIWIWVLSLLKKNYYAHFKVSECVNNAAGIGFHYSHSG-KKSWDGFSDGSPW	290
Common carp - 1	YPLKELLKSITF---RVNS-PCVCQNIWIWVLSLLKKNYYAHFKVSECVNNAAGIGFHYSHSG-KKSWDGFSDGSPW	290
Spotted gar	TFLRCHLSSNSL---SQAH-FNVLEGILFIWGISLLYKISYSEHTLSESLNNAAGLGFGRGYNKHG-NPLWDALSDGNIL	293
Japanese eel	CVLVDVMERYSP---GLAQ-LSAAPTTLVNLVGLALVFRISYSEHWALSAGLNNAAGLGFGRGYSRG-VPRWDGVSDDPW	303
Asian arowana	RILTFGLVSHPP---GLAQ-FWAGTQVLVWVWMSVALRMVYSEHWALSADLNNAAGLGFGRGYSRG-KSSWDGFSGSPW	286
Atlantic herring	HALTIILKVSSV---NLNN-FGAPQGVLVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLCNATGLGFCAKRTG-SQRWNLSDGELW	289
Atlantic salmon	NSLTRLLRDNAS---SLSVSNVLTDLVLIWGLAVVLRIRYSEHWKISECLNNAAGLGFGRGMVKED-SPNWSGLSDGDLW	286
Rainbow trout	NYLTRLLRDNAS---SLSVSNVLTDLVLIWGLAVVLRIRYSEHWKISECLNNAAGLGFGRGMVRED-NPNWSGLSDGDLW	286
Stickleback	CLLVHLLNACDP---S--A-SGPLCGAAVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGLGFWRPCPGD-PPGWSGLSDGDFW	289
Zebra mbuna	FYLVFLLKHLI---DF-N-PGILYGILSTWCLGLVLRIRYSEHWKISECLNNAAGFGFWEVSSGDFYFSKWSGLSDGDFW	288
Tilapia	FYLVYFLKYLH---DF-N-PGILYGILSTWCLGLVLRIRYSEHWKISECLNNAAGFGFWEVSSGDFYFSKWSGLSDGDFW	288
Damselfish	WCLIVLVKHNAY---DPM-D-SGVLGVLWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGFGFWEVSSGDFYFSKWSGLSDGDFW	289
Yellowbelly rockcod	FYVVYLLKHSY---DSYS-S--IYGVLVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGFGFWEKEPED-SPDGCKLSDGDCY	291
Yellow croaker	YCLVYFLKHNAY---NPSK-SIIYGLVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGFGFGENVPGV-SPDWSRLSDGDFW	291
Striped bass	YCLVYFLKHNAY---DPYN-SIFFYGILVWVWMAVVLVLRIRYSEHWKISECLNNAAGFGFWEVSSGDFYFSKWSGLSDGDFW	291
Elephant shark	MFLTNCIRVIEGIDQGFY--CDVSKDILLISMIALMFRAYSQVLLSESLNNAAGLGFEGQAKKE-RCVCSSALSDADIW	301
Frog	SLVSVNLSFQLS---LMT-CRHLNCVIMWTTALLFKITTYSEHWLDESFLCAAGFLTAYH---V-DGFQVTFCDTDIW	289
Coelacanth	FLIRNKESALTI---PQ-SYIMNIFVWNTALLFKITTYSEHWLDESFLCAAGFLTAYH---V-DGFQVTFCDTDIW	293
Cock	AWLEGWLPQM---GWASMGHMAQALLFRIRAYSQVLLDEALAEAGFGAAV-----EHRDLSGHDLW	267
Lizard	NMLRGYICAQAD---QND-CSCFGCVVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGLGFELD--CA-GTAEGILMDADIW	291
Alligator	LAMRGHEGTLT---LAY-CTRFGCVVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGLGFELD--HD-P-THGDLSGTAMW	286
Wild boar	VAMRWAVSVGAG---LTD-CQFECIYVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGLGFELD--GS-TGSEFVDPADIW	291
Mouse	VALRSVAVSAGAG---LDD-CQRLCEIYLMWSTAWLFLKITYSEHWLDDSLHAAFGAEAG--QG-PGEEGYVPDADIW	291
Rat	VALRRVVSAGAG---LDD-CQRLCEIYLMWSTAGLFLKITYSEHWLDDSLHAAFGSEAG--QR-PGEEGYVPDADIW	291
Chimpanzee	VAVSrvVDAGAG---LTD-CQFECIYVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGLGFELD--QS-PGEEGYVPDADIW	291
Human	VAVSRVVDAGAG---LTD-CQFECIYVWVWVLSLLKKNYYAHFKVSECLNNAAGLGFELD--QS-PGEEGYVPDADIW	291
Rabbit	VAMRGLVSTGAG---LSH-CQRLCEIYLMWSTAGLFLKITYSEHWLDDSLHAAFGTGF--QS-PGEDGYVPDADIW	291

Exon 3

Channel catfish	EIESSNISAFARLWRTAAWLRRLVHRSSKMPVLMTECFSSALWHLYPQVAGFLGWA-VAVLGDKHKLKHLSPRL-	365
Red pirahna	EIESTRISAFARRWDTTAWLRRLVQRCSTAPLFMTGFSAWWHLYPQV LGFLGWA-TAVLGDKHKLKHLSPRL-	368
Mexican cavefish	EIESSSTRISAFARRWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPHI VGFLGWA-IAVQGDYKIHHSYIKPKL-	368
Zebrafish	VTASSRPSVFARQWQRTAVDLRKIVNRTSRPLFMTEGFSALWHLYPQI LGFLIWA-VTVQADYKIHHSYIKPKL-	357
Common carp - 2	VTASSRPSVFARQWQRTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQIAG ₂ GFLIWA-ITVQGDYKIHHSYIKPKL-	369
Horned barbel - 2	VTASSRPSVFARQWQRTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQI LGFLIWA-ITVQGDYKIHHSYIKPKL-	368
Goldfish-V1	VTASSRPSVFARQWQRTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQI LGFLIWA-ITVQGDYKIHHSYIKPKL-	335
Goldfish-V2	VTASSRPSVFARQWQRTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQI LGFLIWA-ITVQGDYKIHHSYIKPKL-	309
Horned barbel - 1	VTASSRPSVFARQWQRTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQI LGFLIWA-ITVQGDYKIHHSYIKPKL-	369
Common carp - 1	VTASSRPSVFARQWQRTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQI LGFLIWA-ITVQGDYKIHHSYIKPKL-	368
Spotted gar	TLTTLTRLSEFARMWKTAAWLRRLVQKCHVSPLLLTGFSALWHLYPQL VGFLCWA-ATVEADYRIHHSYIKPKL-	371
Japanese eel	TLTTCSTRPSAFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV LGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	381
Asian arowana	TVRASSRISFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV LGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	364
Atlantic herring	TTTSCSTRSEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV AGFLIWA-TSVDYKIHHSYIKPKL-	367
Atlantic salmon	TTMSCQVSEFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV VGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	364
Rainbow trout	TTMSCQVSEFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV VGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	364
Stickleback	SVTASSRPSVFARQWQRTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV LGFLIWA-ITVQGDYKIHHSYIKPKL-	367
Zebra mbuna	TTTASICMSQFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQHFGVFFTWGA-ATVQADYKIHHSYIKPKL-	366
Tilapia	TTTASICMSQFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQHFGVFFTWGA-ATVQADYKIHHSYIKPKL-	366
Damselfish	TTTASHRMSDFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQHFGVFFTWGA-ATVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Yellowbelly rockcod	TTTASHRMSDFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQHFGVFFTWGA-ATVQADYKIHHSYIKPKL-	367
Yellow croaker	TTTASHRMSDFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQHFGVFFTWGA-ATVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Striped bass	TTTASHRMSDFARHNGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQHFGVFFTWGA-ATVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Elephant shark	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	380
Frog	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	367
Coelacanth	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	371
Cock	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	345
Lizard	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Alligator	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	364
Wild boar	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Mouse	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Rat	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Chimpanzee	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Human	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	369
Rabbit	TLTTLTKISEFTRQWGTAAWLRRLVQRCSTRAPQLMTGFSALWHLYPQV FGFLWGA-VAVQADYKIHHSYIKPKL-	369

Exon 3

Channel catfish	TTAWRKGLFTCLSLYLYTQVVIACVVTTELQSLALMLFCTTHIALFPLASIL--ILFIL-----	423
Red pirahna	TVLWKKRLYSLLGWAYTQAVITCVLTTELQSSDAVMLLYPHTHVVVPFVTVV--ILFIL-----	426
Mexican cavefish	TTPWKKGLYACVWAYTQVIGICVLTTELQSFVAVKLLWTTTRIALVPLASV--ILFIL-----	426
Zebrafish	NSLWKKRLYVCLNVAFTOLTISCVVVCVELQSLASVKKLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	415
Common carp - 2	TSKWRKWLIVCLNVAFTOLTISCVVVCVELQSLASVKKLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	426
Horned barbel - 2	TSKWRKWLIVCLNVAFTOLTISCVVVCVELQSLASVKKLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	426
Goldfish-V1	TSKWRKWLIVCLNVAFTOLTISCVVVCVELQSLASVKKLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	393
Goldfish-V2	TSKWRKWLIVCLNVAFTOLTISCVVVCVELQSLASVKKLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	367
Horned barbel - 1	TSKWRKWLIVCLNVAFTOLTISCVVVCVELQSLASVKKLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	427
Common carp - 1	TSKWRKWLIVCLNVAFTOLTISCVVVCVELQSLASVKKLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	426
Spotted gar	DSKVKRLIYKVLTFQTLVIAICVVIITELRYLSSVWLLFKAYIGLFPLLNCL--VLVVLPRKQKIKVLY-	439
Japanese eel	TSPATQRLYRCLGTAHTOLLIAVAVVAVELRGACFMWLLWKTYSISVFLLYVI--LLFFLPQNIKPKNE-	447
Asian arowana	SSPGKRLVYTCLSAQTLVITWVAVELRNISVWLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	426
Atlantic herring	TSPWTRKVFRCLSAQTLVITWVAVELRNISVWLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	427
Atlantic salmon	TSTRRLVTRTCLWLTQVIAVAVVAVELRNISVWLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	422
Rainbow trout	TSTRRLVTRTCLWLTQVIAVAVVAVELRNISVWLLWSSCIAVFPILLSAL--ILFIL-----	422
Stickleback	SPAWRK-VYACLSWINTOMNVACIVTAVELRVSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	430
Zebra mbuna	TPTQRK-IYTFVNTINTOMIVTCIVIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	431
Tilapia	TPTQRK-IYTFVNTINTOMIVTCIVIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	431
Damselfish	SPAGRK-IYSVLGINTOMIVTCIVIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	433
Yellowbelly rockcod	SSTQSK-IYSCLGINTOMIVTCIVIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	430
Yellow croaker	SSSWRK-IYTCLSWINTOMIVTCIVIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	436
Striped bass	SSTWRK-IYTCLSWINTOMIVTCIVIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	432
Elephant shark	KSRLLLIVYKVFVITQTLITAYILIAVELRLTAYVLMCRSACILSPVMYMLVLMYIVSQH-	445
Frog	QSWCTRVLRYRIFTQLITOLIVIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	429
Coelacanth	NSWFTKQLFKVFTVITQTLITAYILIAVELRLTAYVLMCRSACILSPVMYMLVLMYIVSQH-	435
Cock	TSCVAKLLYRGTTAVFTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	424
Lizard	KSQPQRVVCQSLTCHTQLVVAYIIIAVEFRNLSGLRLLSSTTVGLVPLFNIL--LLLILLKHNVT-	443
Alligator	KSWCTRLLYKALTAVFTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	429
Wild boar	RSQLMWLLYRTLTVAHTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	435
Mouse	RSWPLRLLYRALTVAHTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	435
Rat	RSWPLRLLYRALTVAHTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	435
Chimpanzee	RSWPMRLFYRTLTVAHTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	435
Human	RSWPMRLFYRTLTVAHTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	435
Rabbit	RSWPLRLLYRTLTVAHTOLIIAYIMVAVEMRSFSLWLLCTSYISFFPLLYCI--SLLLAKRATQK-	442



S5 Fig. Representative original uncropped Western blot corresponding to the bands shown in Fig 8. Blot shows GOAT levels in goldfish intestinal fragments exposed (or not, control) to different concentrations of goldfish acylated ghrelin during 30 min. Molecular size marker is shown in the left lane, and weights of each protein band (in kDa) is indicated. The goldfish GOAT has a molecular weight of around 45 and 42 kDa (GOAT-V1 and GOAT-V2, respectively).

Brain Mapping of Ghrelin O-Acyltransferase in Goldfish (*Carassius Auratus*): Novel Roles for the Ghrelinergic System in Fish?

AYELÉN M. BLANCO, AÍDA SÁNCHEZ-BRETAÑO, MARÍA J. DELGADO,
AND ANA I. VALENCIANO*

Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University,
Madrid, 28040, Spain

ABSTRACT

Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is the enzyme responsible for acylation of ghrelin, a gut-brain hormone with important roles in many physiological functions in vertebrates. Many aspects of GOAT remain to be elucidated, especially in fish, and particularly its anatomical distribution within the different brain areas has never been reported to date. The present study aimed to characterize the brain mapping of GOAT using RT-qPCR and immunohistochemistry in a teleost, the goldfish (*Carassius auratus*). Results show that *goat* transcripts are expressed in different brain areas of the goldfish, with the highest levels in the vagal lobe. Using immunohistochemistry, we also report the presence of GOAT immunoreactive cells in different encephalic areas, including the telencephalon, some hypothalamic nuclei, pineal gland, optic tectum and cerebellum, although they are especially abundant in the hindbrain. Particularly, an important signal is observed in the vagal lobe and some fiber tracts of the brainstem, such as the medial longitudinal fasciculus, Mauthneri fasciculus, secondary gustatory tract and spinothalamic tract. Most of the forebrain areas where GOAT is detected, particularly the hypothalamic nuclei, also express the *ghs-r1a* ghrelin receptor and other appetite-regulating hormones (e.g., orexin and NPY), supporting the role of ghrelin as a modulator of food intake and energy balance in fish. Present results are the first report on the presence of GOAT in the brain using imaging techniques. The high presence of GOAT in the hindbrain is a novelty, and point to possible new functions for the ghrelinergic system in fish. *Anat Rec*, 299:748–758, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Abbreviations: Cer = Cerebellum; FLM = Medial longitudinal fasciculus; FM = Mauthneri fasciculus; GC = *griseum centrale*; GHS-R = growth hormone secretagogue receptor; GOAT = Ghrelin O-acyltransferase; NAPv = Anterior periventricular nucleus; NE = Entopeduncular nucleus; NLTY = Inferior part of the lateral tuberal nucleus; NPGm = Medial part of the preglomerular nucleus; NPO = Preoptic nucleus; NPP = Periventricular preoptic nucleus; NPPv = Posterior periventricular nucleus; NRL = Lateral recess nucleus; OD = optical density; OTec = Optic tectum; PGZ = Periventricular grey zone; Pin = Pineal gland; SNK = Student-Newman-Keuls; TGS = Secondary gustatory tract; TST = Spinothalamic tract; VL = Vagal lobe.

Grant sponsor: Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO); Grant number: AGL2013-46448-C3-2-R.

*Correspondence to: Ana I. Valenciano, Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University, Calle Jose Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain. E-mail: aivalenciano@bio.ucm.es

Received 13 January 2016; Revised 16 February 2016; Accepted 22 February 2016.

DOI 10.1002/ar.23346

Published online 11 April 2016 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).



CAPÍTULO 2

La alimentación en la regulación del sistema ghrelinérgico del carpín

CAPÍTULO 2

RESUMEN

La alimentación es uno de los principales reguladores de la síntesis y secreción de ghrelina, así como del funcionamiento del sistema ghrelinérgico en general. En los mamíferos, se sabe que los niveles circulantes de ghrelina se elevan preprandialmente y disminuyen después de una comida, observaciones que han llevado a considerar a la ghrelina como una señal iniciadora de la alimentación. Asimismo, la expresión y secreción de esta hormona incrementan tras periodos de privación de alimento más o menos prolongados, y son reguladas por otros aspectos relacionados con la ingesta, como el patrón de alimentación y la composición nutritiva de la dieta. Alguno de estos factores también parecen afectar a otros elementos del sistema ghrelinérgico, como a la GOAT o a los receptores de ghrelina, aunque el número de estudios realizados es muy limitado. En los peces, apenas se ha investigado la posible regulación ejercida por diferentes aspectos de la alimentación, y los escasos estudios disponibles muestran en ocasiones observaciones opuestas, como ocurre con los efectos del ayuno. En este contexto, este capítulo se ha enfocado al estudio del papel de la alimentación como modulador del sistema ghrelinérgico en el carpín, a fin de intentar esclarecer algunas de las controversias existentes en la bibliografía y de describir posibles nuevos factores que intervengan en la regulación de dicho sistema.

En primer lugar, nos planteamos estudiar los posibles cambios periprandiales de los diferentes componentes del sistema ghrelinérgico. Para ello, siete grupos de carpines aclimatados a un fotoperiodo 12L:12D y alimentados diariamente a las 12:00 (ZT-4) fueron sacrificados a la hora habitual de alimentación y 1 y 3 horas antes y después de la misma para describir los perfiles periprandiales de secreción y expresión de los componentes del sistema ghrelinérgico. Con el fin de determinar el efecto de una ingesta individual de comida,

en los tiempos correspondientes a las horas postprandiales se sacrificaron dos grupos de peces, en uno de ellos el día del experimento habían sido alimentados a su horario habitual, y en el otro, los peces no recibieron el alimento. A continuación, se tomaron muestras de sangre para medir los niveles circulantes de ghrelina (en sus dos formas, acilada y desacilada) y GOAT mediante ELISAs (véase detalles en el Anexo metodológico V), y de tejidos centrales y periféricos para medir expresión de *preproghrelina*, *goat* y *ghs-r* mediante RT-qPCR (véase detalles en el Anexo metodológico II). Los resultados de este estudio (**Figura 15**) permiten demostrar la existencia de un perfil diferencial en los niveles circulantes de ghrelina acilada y desacilada en torno al horario habitual de alimentación marcado por un aumento preprandial en los niveles circulantes de ghrelina acilada y GOAT, lo que sugiere que esta forma de la hormona podría estar actuando como señal iniciadora de la alimentación en el carpín. Esta observación está respaldada por un incremento preprandial en los niveles de expresión de *preproghrelina* en el bulbo intestinal. Asimismo, los resultados obtenidos parecen indicar que el subtipo de receptor GHS-R1a1 podría estar implicado en esta acción, puesto que sus niveles también incrementan preprandialmente. Por otro lado, hemos observado importantes variaciones postprandiales en la expresión de la mayor parte de los componentes del sistema a nivel central, especialmente en telencéfalo y lóbulo vagal, sugiriendo que en estas dos regiones encefálicas el sistema ghrelinérgico tendría una importante función tras la alimentación.

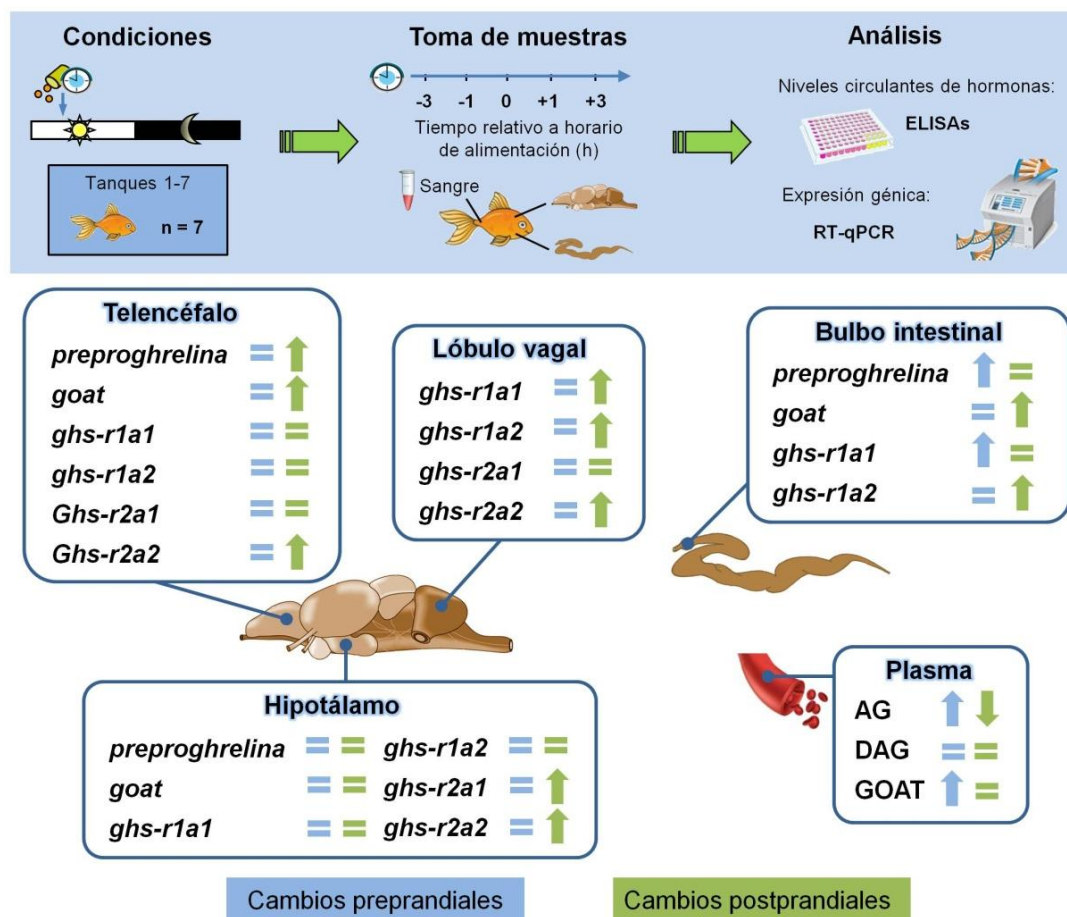


Figura 15. Diseño experimental y resultados obtenidos en el estudio de los cambios periprandiales en el sistema ghrelinérgico del carpín. La parte superior muestra el diseño experimental y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles génicos y/o proteicos no modificados, ↑: niveles incrementados, ↓: niveles reducidos. AG, ghrelina acilada; DAG, ghrelina desacilada; GOAT, ghrelina O-aciltransferasa; GHS-R, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento.

El segundo abordaje experimental se diseñó para analizar las modificaciones inducidas por periodos de ayuno de corta (7 días) y larga (30 días) duración en los niveles circulantes de ghrelina y GOAT, y en la expresión de los diferentes componentes del sistema ghrelinérgico en localizaciones centrales y periféricas del carpín. Los resultados obtenidos de este estudio aparecen esquematizados en la **Figura 16**. A diferencia de las observaciones generales publicadas en los mamíferos, los resultados de este estudio han demostrado que los periodos de ayuno analizados no modifican los niveles circulantes de ghrelina acilada, desacilada y GOAT. No obstante, la privación de alimentos conduce a importantes incrementos en la expresión de *preproghrelina* y *goat* en el telencéfalo y el bulbo intestinal. Además, se ha observado una implicación diferencial de los distintos subtipos de receptores de ghrelina ante dicha situación desfavorable de ayuno, siendo el subtipo GHS-R1a (y particularmente el GHS-R1a2) el que parece estar más implicado puesto que es el más sensible a la falta de alimento en los dos tejidos mencionados. En el lóbulo vagal, únicamente los receptores de

tipo 2 resultan modificados por la privación de alimento y parece existir una implicación diferencial de los dos subtipos (a y b) en función de la duración del periodo de ayuno. No se observaron variaciones significativas en la expresión del sistema ghrelinérgico en el hipotálamo por la privación de alimento.

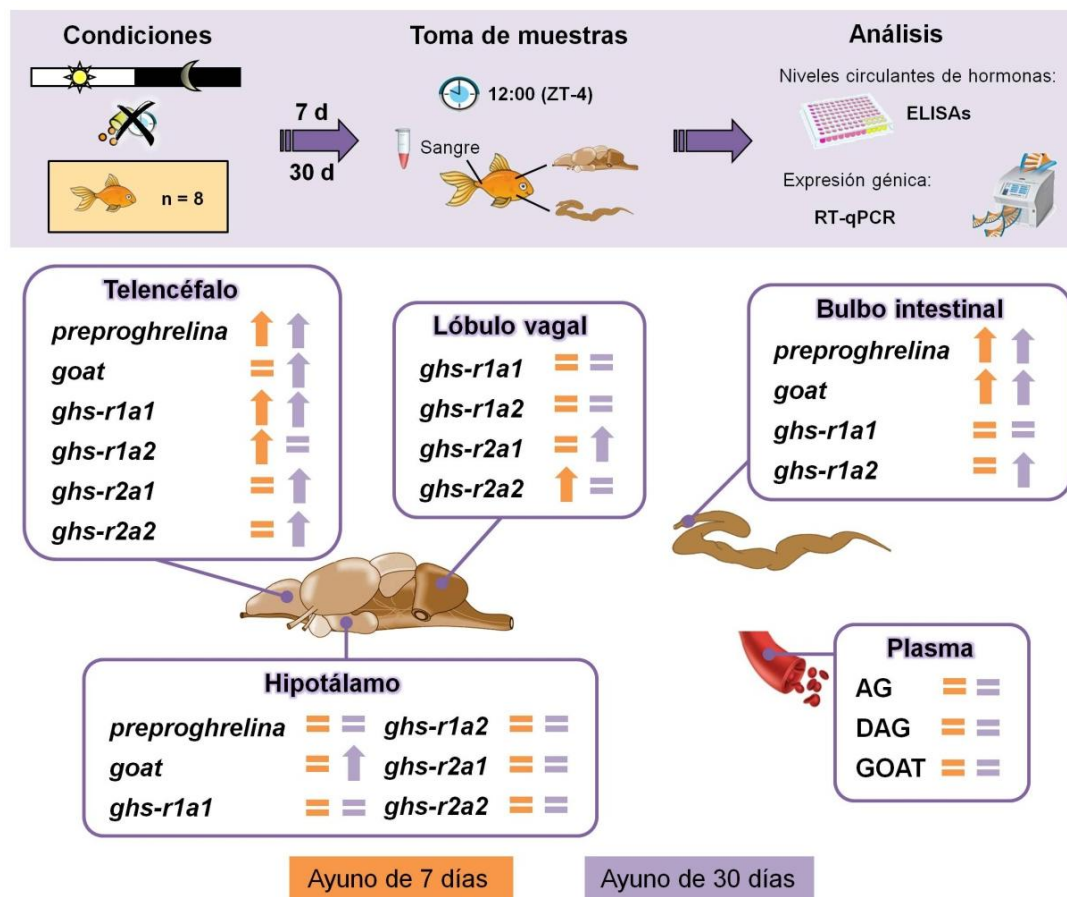


Figura 16. Diseño experimental y resultados obtenidos en el estudio de las modificaciones inducidas en el sistema ghrelinérgico por periodos de ayuno de corta (7 días) y larga (30 días) duración en el carpín. La parte superior muestra el diseño experimental y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles génicos y/o proteicos no modificados, ↑: niveles incrementados, ↓: niveles reducidos. AG, ghrelina acilada; DAG, ghrelina desacilada; GOAT, ghrelina O-aciltransferasa; GHS-R, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento.

En último lugar, hemos analizado si la composición de la dieta es capaz de modificar el sistema ghrelinérgico del carpín. Para ello, se establecieron cinco grupos experimentales que fueron alimentados una vez al día con los siguientes tipos de dietas: dieta control, dieta rica en carbohidratos, dieta rica en proteínas, dieta rica en lípidos y dieta muy rica en lípidos. Al cabo de 7 y 28 días, los carpines se sacrificaron y se tomaron muestras de tejidos centrales y periféricos para análisis de expresión génica. Los resultados de este estudio (**Figura 17**) demuestran una regulación diferencial de la expresión de varios componentes del sistema ghrelinérgico inducida por los distintos macronutrientes, que parece ser dependiente del

órgano en estudio. Así, la composición de la dieta no parece alterar la expresión génica del sistema ghrelinérgico hipotalámico, mientras que las dietas ricas tanto en carbohidratos como en lípidos producen incrementos significativos en la expresión de *preproghrelina*, *goat* y *ghs-r1a* en la hipófisis. A nivel del sistema digestivo, la alimentación con una dieta rica en carbohidratos a largo plazo conlleva una mayor expresión de *goat* y *ghs-r1* en el intestino anterior, pero no modifica su expresión en el hígado. Por el contrario, una dieta rica en proteínas no modifica el sistema ghrelinérgico en el intestino anterior, pero conlleva una disminución de la expresión de *preproghrelina* y *ghs-r1* en el hígado al cabo de una semana.

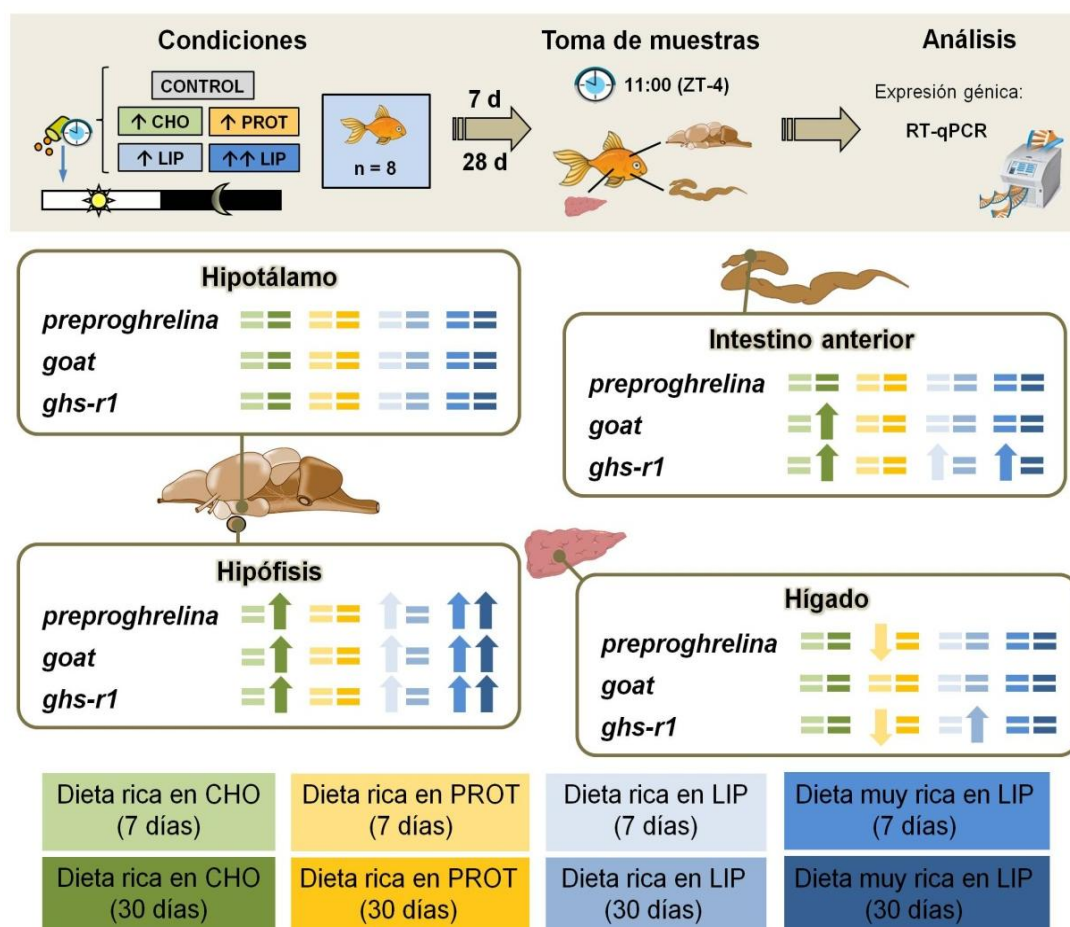


Figura 17. Diseño experimental y resultados obtenidos en el estudio de los efectos de la composición macronutritiva de la dieta sobre el sistema ghrelinérgico del carpín. La parte superior muestra el diseño experimental y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles génicos y/o proteicos no modificados, ↑: niveles incrementados, ↓: niveles reducidos. CHO, carbohidratos; LIP, lípidos; PROT, proteínas.

En conclusión, los resultados presentados en este Capítulo 2 muestran que la alimentación, referida en términos tanto de ingesta diaria, periodos de ayuno y composición de la dieta, es un importante modulador del sistema ghrelinérgico del carpín, afectando tanto a la secreción de ghrelina a la sangre como a la expresión génica de los diferentes

componentes del sistema. Estos resultados forman parte de las siguientes publicaciones científicas:

- Blanco AM, Gómez-Boronat M, Redondo I, Valenciano AI, Delgado MJ (2016) Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Physiol B* 186: 727-738.
- Blanco AM, Bertucci JI, Delgado MJ, Valenciano AI, Unniappan S (2016) Tissue-specific expression of ghrelinergic and NUCB2/nesfatin-1 systems in goldfish (*Carassius auratus*) is modulated by macronutrient composition of diets. *Comp Biochem Physiol A* 195: 1-9.

Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*)

A. M. Blanco¹ · M. Gómez-Boronat¹ · I. Redondo¹ · A. I. Valenciano¹ · M. J. Delgado¹

Received: 2 February 2016 / Revised: 26 March 2016 / Accepted: 29 March 2016 / Published online: 9 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The periprandial profile and effects of short- (7 days) and long-term (30 days) fasting on the ghrelinergic system were studied in goldfish (*Carassius auratus*). Plasma levels of acyl-ghrelin, desacyl-ghrelin, and ghrelin *O*-acyl transferase (GOAT) were analyzed by enzyme immunoassays, and expression of *preproghrelin*, *goat* and *growth hormone secretagogue* receptors (*ghs-r*) was quantified by real-time PCR. Circulating levels of acyl-ghrelin and GOAT rise preprandially, supporting the role of acyl-ghrelin as a meal initiator in this teleost. Consistently, *preproghrelin* and *ghs-r1a1* expression increases 1 h before feeding time in intestinal bulb, suggesting that this receptor subtype might be involved in the preprandial action of ghrelin in this tissue. Significant postfeeding variations are detected for *preproghrelin* in telencephalon, *goat* in telencephalon and hypothalamus, *ghs-r1a1* in vagal lobe, *ghs-r1a2* and *ghs-r2a1* in hypothalamus and *ghs-r2a2* in telencephalon and vagal lobe, especially in unfed fish. Short- and long-term fasting significantly increase *preproghrelin* expression in telencephalon and gut. *Goat* expression is upregulated by short-term fasting in telencephalon and hypothalamus, and by both short- and long-term fasting in gut. Expression of *ghs-r* increases by fasting in telencephalon, while an upregulation of type 2, but not type 1, receptors is observed in vagal lobe. In intestinal bulb, *ghs-r1a2* transcripts increase after both short- and long-term fasting. These results show a high dependence of

the ghrelinergic system on feeding and nutritional status in fish, and demonstrate for the first time a differential implication of the various components of this system suggesting different roles for the four ghrelinergic receptor subtypes.

Keywords Feeding · Preproghrelin · Ghrelinergic system · Starvation · Fish · Teleost · Food deprivation

Introduction

Ghrelin is a peptide hormone identified for the first time in rat stomach by Kojima et al. (1999) as an endogenous ligand for the growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R), also named ghrelin receptor. Although discovered as a 28-amino acid peptide, ghrelin is shorter in many species, including goldfish, in which the peptide has been characterized as 11 molecular forms consisting of 14-, 17-, 18- and 19-amino acid residues (Miura et al. 2009). At present, the gastrointestinal tract is known to be the main site for the synthesis of this hormone in vertebrates (Kaiya et al. 2008), although it has been also detected in other peripheral and central locations (Cowley et al. 2003). In fish, the highest levels of ghrelin mRNA occur in the stomach or the foregut, depending on the species (Breves et al. 2009; Kaiya et al. 2003; Unniappan et al. 2002), with low levels detected in other peripheral tissues and also in the brain (Amole and Unniappan 2009; Unniappan et al. 2002). The first physiological role described for ghrelin as a ligand for the GHS-R was the stimulation of growth hormone release from pituitary (Kojima et al. 1999). Later, many other functions have been attributed to this peptide, including stimulation of food intake, carbohydrate utilization and adiposity, and regulation of insulin secretion, among others (Delporte 2013; Heppner et al. 2011; Lim et al. 2011; Sato et al. 2012).

Communicated by G. Heldmaier.

✉ M. J. Delgado
mjdelgad@bio.ucm.es

¹ Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain



Tissue-specific expression of ghrelinergic and NUCB2/nesfatin-1 systems in goldfish (*Carassius auratus*) is modulated by macronutrient composition of diets



Ayelén M. Blanco^{a,b}, Juan I. Bertucci^{a,c}, María J. Delgado^b, Ana I. Valenciano^b, Suraj Unniappan^{a,*}

^a Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Department of Veterinary Biomedical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan S7N 5B4, Canada

^b Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

^c Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús (IIB-INTECH), 7130 Chascomús, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2015

Received in revised form 13 January 2016

Accepted 19 January 2016

Available online 22 January 2016

Keywords:

Carbohydrate

Protein

Fat

Ghrelin

GOAT

GHS-R

Nesfatin-1

Fish

ABSTRACT

The macronutrient composition of diets is a very important factor in the regulation of body weight and metabolism. Several lines of research in mammals have shown that macronutrients differentially regulate metabolic hormones, including ghrelin and nesfatin-1 that have opposing effects on energy balance. This study aimed to determine whether macronutrients modulate the expression of ghrelin and the nucleobindin-2 (NUCB2) encoded nesfatin-1 in goldfish (*Carassius auratus*). Fish were fed once daily on control, high-carbohydrate, high-protein, high-fat and very high-fat diets for 7 (short-term) or 28 (long-term) days. The expression of *preproghrelin*, *ghrelin O-acyl transferase (goat)*, *growth hormone secretagogue receptor 1 (ghs-r1)* and *nucb2/nesfatin-1* mRNAs was quantified in the hypothalamus, pituitary, gut and liver. Short-term feeding with fat-enriched diets significantly increased *nucb2* mRNA levels in hypothalamus and liver, *preproghrelin*, *goat* and *ghs-r1* expression in pituitary, and *ghs-r1* expression in gut. Fish fed on a high-protein diet exhibited a significant reduction in *preproghrelin* and *ghs-r1* mRNAs in the liver. After long-term feeding, fish fed on high-carbohydrate and very high-fat diets had significantly increased *preproghrelin*, *goat* and *ghs-r1* expression in pituitary. Feeding on a high-carbohydrate diet also upregulated *goat* and *ghs-r1* transcripts in gut, while feeding on a high-fat diet elicited the same effect only for *ghs-r1* in liver. *Nucb2* expression increased in pituitary, while it decreased in gut after long-term feeding of a high-protein diet. Collectively, these results show for the first time in fish that macronutrients differentially regulate the expression of ghrelinergic and NUCB2/nesfatin-1 systems in central and peripheral tissues of goldfish.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Food intake, one of the most basic needs common to all animals, is regulated by both central and peripheral endocrine signals (Konturek et al., 2004; Lenard and Berthoud, 2008; Sobrino Crespo et al., 2014; Volkoff et al., 2005). Feeding regulation is achieved by a number of neuroendocrine signals, which act either as orexigens or anorexigens, enhancing or inhibiting food intake, respectively. Two such regulators of energy balance are ghrelin and nesfatin-1. Ghrelin is a 28 amino acid peptide discovered as a natural ligand for the growth hormone

secretagogue receptor (GHS-R; Kojima et al., 1999), now known as the ghrelin receptor (Yin et al., 2014). It is post-translationally modified by the attachment of a medium-chain fatty acid, typically octanoate, to the third serine residue of the N-terminal region of the peptide. This post-translational acyl modification is catalyzed by a recently discovered member of the membrane-bound O-acyl transferase (MBOAT) family, named ghrelin O-acyl transferase (GOAT) (Gutierrez et al., 2008; Hatef et al., 2015; Yang et al., 2008). Ghrelin is particularly abundant in the stomach and intestine, and is expressed in the brain and peripheral organs at relatively lower levels (Date et al., 2000; Gnanapavan et al., 2002; Kaiya et al., 2003; Kojima et al., 1999; Unniappan et al., 2002). Besides its potent stimulatory effect on GH secretion, ghrelin is involved in the regulation of a wide variety of physiological processes, particularly metabolism and energy balance (Cummings, 2006; Kaiya et al., 2008; Kojima and Kangawa, 2005). It is the only known hunger signal from peripheral tissues and has been shown to potently stimulate food intake in mammals (Asakawa et al.,

Abbreviations: AgRP, Agouti-related peptide; CHO, Carbohydrates; GHS-R, Growth hormone secretagogue receptor; GOAT, Ghrelin O-acyl transferase; MBOAT, Membrane-bound O-acyltransferase; NPY, Neuropeptide Y; NUCB2, Nucleobindin-2; OD, Optical density; POMC, Proopiomelanocortin; RT-qPCR, Real time quantitative polymerase chain reaction; SEM, Standard error of the mean; SNK, Student–Newman–Keuls.

* Corresponding author.

E-mail address: suraj.unniappan@usask.ca (S. Unniappan).

The background of the slide is a vibrant, impressionistic painting of several koi fish in a pond. The fish are depicted in various colors, including bright yellow, orange, and red, with some having black spots. They are swimming in water rendered in shades of blue and purple. The brushstrokes are visible, giving the painting a textured, artistic feel.

CAPÍTULO 3

La ghrelina como regulador de la funcionalidad del sistema digestivo del carpín

CAPÍTULO 3

RESUMEN

Las acciones de la ghrelina en la regulación de la ingesta y el balance energético son quizás las funciones más estudiadas de esta hormona. No obstante, muchos aspectos permanecen aún desconocidos, especialmente en peces. Por ello, este capítulo se ha dirigido al estudio de los mecanismos subyacentes a las acciones orexigénicas de la ghrelina en el carpín, y a investigar posibles nuevas funciones relacionadas con la digestión, absorción de nutrientes y metabolismo energético en las que esta hormona podría estar implicada. Hemos enfocado el estudio hacia las posibles acciones que la ghrelina pudiera estar ejerciendo a nivel local, del tracto digestivo, no sólo endocrinas sino también paracrinas o incluso autocrinas. Los resultados de este capítulo se presentan a continuación de forma resumida en tres apartados:

1. *La ghrelina y su acción sobre la expresión de enzimas digestivas*

El primer objetivo fue estudiar si la ghrelina interviene en la modulación de enzimas digestivas en el carpín. Concretamente hemos seleccionado la enzima glucosídica sacarasa-isomaltasa, las enzimas proteolíticas aminopeptidasa A y tripsina, y la enzima lipolítica lipoproteína lipasa, previamente descritas en el intestino e hígado del carpín (Sarbah, 1951; Cheng *et al.*, 2009; Butt *et al.*, 2017). Para abordarlo, en primer lugar se estudió la localización de dichas enzimas en relación a la ghrelina y su receptor GHS-R1a en las células endocrinas del intestino y el hígado del carpín utilizando técnicas de inmunohistoquímica (veáanse detalles metodológicos en el Anexo metodológico IV). Este estudio demostró la presencia de células positivas para ghrelina, GHS-R1a, sacarasa-isomaltasa, aminopeptidasa A y lipoproteína lipasa en la porción más interna de la mucosa intestinal del carpín. Las tres

enzimas digestivas estudiadas también fueron detectadas en el borde en cepillo de los enterocitos. En el hígado, se detectaron algunas células dispersas expresando ghrelina, GHS-R1a, sacarasa-isomaltasa, tripsina y lipoproteína lipasa. Además, los resultados indican la presencia de células que coexpresan ghrelina y cada una de las enzimas digestivas, así como GHS-R1a y enzimas digestivas, en el intestino y en el hígado del carpín (**Figura 18**).

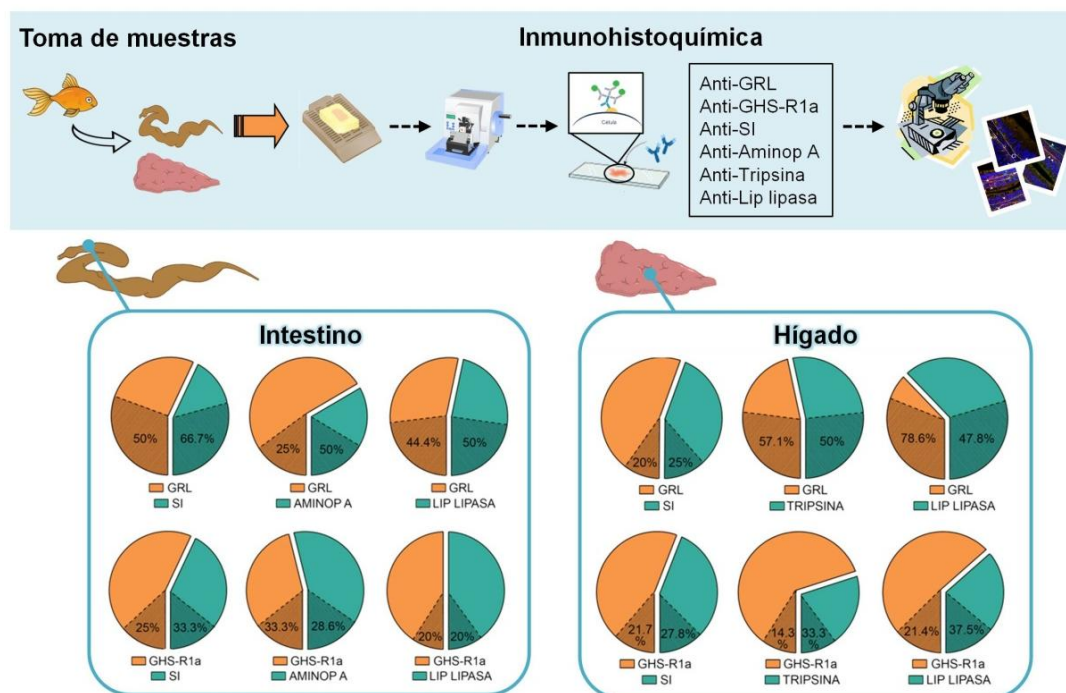


Figura 18. Procedimiento y resultados obtenidos en las tinciones inmunohistoquímicas realizadas para analizar la posible colocalización de GRL/GHS-R1a y sacarasa-isomaltasa/aminopeptidasa A/tripsina/lipoproteína lipasa en el intestino y el hígado del carpín. La parte superior muestra el procedimiento y la parte inferior los resultados esquematizados. Cada gráfico circular indica la abundancia relativa de GRL/GHS-R1a (■) y de sacarasa-isomaltasa/aminopeptidasa A/tripsina/lipoproteína lipasa (■) en las células de cada tejido. El área sombreada de los círculos representa el porcentaje de células que localizan las dos proteínas estudiadas en cada caso. AMINOP A, aminopeptidasa A; GHS-R1a, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento de tipo 1a; GRL, ghrelina; LIP LIPASA, lipoproteína lipasa; SI, sacarasa-isomaltasa.

La colocalización de ghrelina y/o su receptor con diferentes enzimas digestivas en células del intestino y el hígado podría sugerir una posible interacción entre el sistema ghrelinérgico y dichas enzimas. Para investigarlo, estudiamos si la ghrelina modula la expresión y/o actividad de las enzimas digestivas en dichos tejidos *in vitro*. Para ello realizamos cultivos de explantes primarios de intestino e hígado expuestos (o no, grupo control) a diferentes concentraciones de ghrelina acilada (0,1, 1 y 10 nM) durante 30, 60 y 120 minutos, tras lo cual se procedió a la recogida de los tejidos para cuantificar los niveles de expresión génica y proteica de enzimas digestivas mediante RT-qPCR y *Western blot*, respectivamente (véanse detalles en Anexos metodológicos II y III). Nótese que el hígado del carpín es difuso y

contiene células pancreáticas embebidas. Los resultados de este estudio (**Figura 19A**) han demostrado que la ghrelina estimula la expresión de la mayoría de las enzimas digestivas analizadas en el intestino y el hígado del carpín, siendo su efecto dependiente de la concentración y del tiempo de incubación. Entre las diferentes enzimas estudiadas, los efectos más notables de la ghrelina, tanto en intestino como en hígado, se observan para la sacarasa-isomaltasa, cuya expresión génica y proteica incrementa 3-8 veces y 2-3 veces, respectivamente, respecto al grupo control. Este hallazgo podría indicar una implicación particular de la ghrelina en la digestión de hidratos de carbono. Para confirmar la especificidad de estas acciones de la ghrelina y determinar si están mediadas por su receptor GHS-R1a, se llevó a cabo un cultivo de explantes de intestino e hígado empleando un antagonista del GHS-R1a ([D-Lys3]-GHRP-6), que se añadió al cultivo 15 minutos antes de la adición de ghrelina. Los resultados obtenidos muestran que la preincubación de los tejidos con este antagonista bloquea los efectos estimuladores de la ghrelina sobre la expresión génica de las enzimas digestivas, apoyando que las acciones de este péptido son específicas y están mediadas por su unión al receptor GHS-R1a (**Figura 19B**).

A la vista de estos resultados, nos preguntamos ¿qué vía/s de señalización están implicadas en la transducción de la señal intracelular? Para responder a esta pregunta, se realizó un estudio *in vitro* de explantes intestinales y hepáticos que, previo a la adición de ghrelina, se incubaron en presencia de dos agentes implicados en las vías de señalización de la PLC/PKC/IP₃ y de la AC/AMPc/PKA: el U73122 (inhibidor de la PLC) y el H89 (inhibidor de la PKA). Los resultados obtenidos (**Figura 19B**) sugieren que la unión de la ghrelina al receptor GHS-R1a activaría ambas vías de señalización, ya que casi todos los incrementos de expresión génica inducidos por ghrelina son bloqueados con alguno de los dos inhibidores. Además, los resultados obtenidos apuntan a que el receptor GHS-R1a estaría utilizando estas dos vías de manera diferencial dependiendo, en última instancia, de la enzima digestiva cuya expresión está siendo modulada. Por ejemplo, en el intestino, la activación de la vía de la PLC/PKC/IP₃ induciría la expresión de *sacarasa-isomaltasa*, mientras que la expresión de *lipoproteína lipasa* se estimularía a través de la vía de la AC/AMPc/PKA. En el aumento de la expresión de *aminopeptidasa A* parecen estar implicadas ambas rutas de señalización intracelular. En el hígado, el efecto bloqueante de ambos inhibidores sobre las acciones de la ghrelina parece depender de la concentración de esta última. Así, concentraciones bajas o intermedias de ghrelina parecen ejercer su acción sobre la expresión génica de las enzimas digestivas a través de la vía de la PLC/PKC/IP₃, mientras que los efectos de las concentraciones altas de ghrelina estarían mediados principalmente por la vía de la AC/AMPc/PKA.

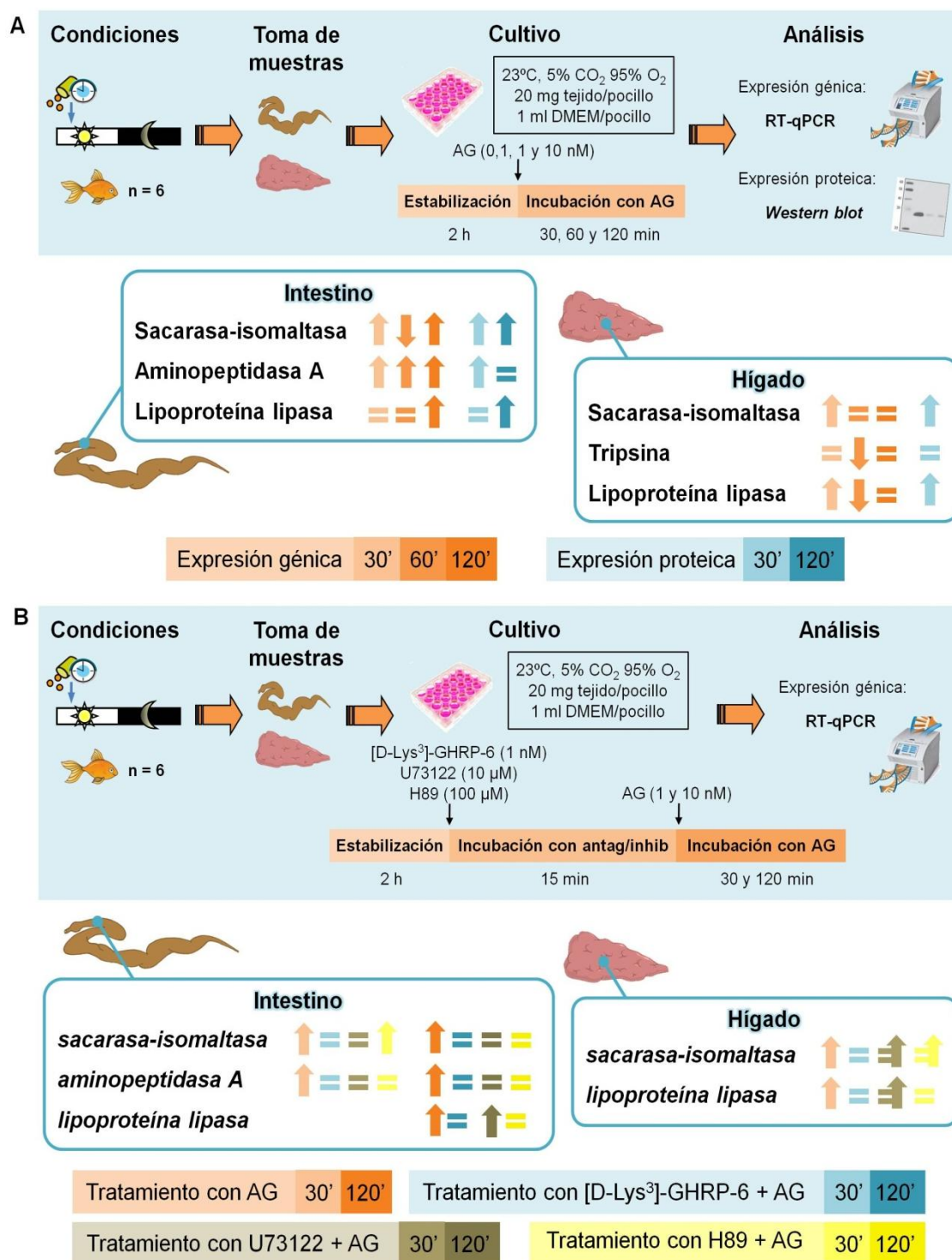


Figura 19. Diseños experimentales y principales resultados obtenidos en el estudio *in vitro* de los efectos de ghrelina sobre enzimas digestivas en el carpín. A. Efectos concentración- y tiempo-dependientes de ghrelina sobre enzimas digestivas. B. Tipo de receptor y vías de señalización intracelular implicadas. La parte superior de cada subfigura muestra los diseños experimentales y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles génicos y/o proteicos no modificados, ↑: niveles incrementados, ↓: niveles reducidos. [D-Lys³]-GHRP-6, péptido liberador de hormona de crecimiento 6 [D-Lys³]; AG, ghrelina acilada; H89, inhibidor de la PKA; U73122, inhibidor de la PLC.

En conclusión, este estudio demuestra la existencia de una importante interacción entre el sistema ghrelinérgico y algunas enzimas digestivas en el intestino y el hígado del carpín. La realización de cultivos empleando un antagonista del receptor GHS-R1a y de inhibidores de vías de señalización intracelular proporciona evidencias de que el subtipo de receptor GHS-R1a, a través de las vías de la PLC-PKC y AC-PKA, estaría mediando dichas acciones de la ghrelina *in vitro*. Estos hallazgos sugieren que la ghrelina, además de su papel orexigénico, podría intervenir en la regulación de la digestión de macronutrientes en los peces.

2. La ghrelina y su rol en el transporte intestinal de glucosa

El objetivo de este apartado fue conocer si la ghrelina interviene en el transporte de glucosa a través de las paredes intestinales en los peces. En primer lugar, estudiamos la distribución anatómica de los principales transportadores de glucosa en el intestino del carpín utilizando técnicas inmunohistoquímicas. Los resultados obtenidos han demostrado que las células de las vellosidades intestinales del carpín contienen los tres tipos de transportadores previamente descritos en mamíferos: el transportador de glucosa por difusión facilitada de tipo 2 (GLUT2) y los cotransportadores sodio-glucosa de tipo 1 y 2 (SGLT1 y SGLT2). Se observó que la gran mayoría de las células inmunopositivas para cada uno de los transportadores se localizan a lo largo del lado basal de la mucosa intestinal, adyacente a la lámina propia, si bien también se detectaron algunas células positivas para GLUT2 y SGLT1 en la submucosa así como una pequeña población de células expresando SGLT1 en el borde en cepillo de la mucosa intestinal. La cuantificación de estas poblaciones celulares reveló que, de los tres transportadores estudiados, las células GLUT2+ son las más abundantes (51,5%), seguidas por las células SGLT1+ (30,8%) y las células SGLT2+ (17,7%). Al realizar dobles inmunotinciones de secciones de intestino empleando anticuerpos para ghrelina y para cada uno de los tres transportadores de glucosa observamos la existencia de colocalización de ghrelina y GLUT2 y de ghrelina y SGLT2 en algunas células de la mucosa. De igual manera hemos estudiado la posible colocalización entre los transportadores de glucosa y la GOAT, encontrando que una pequeña cantidad (28%) de células positivas para GOAT expresan simultáneamente GLUT2, aunque no se observó colocalización con SGLT1 ni con SGLT2. Por último, se detectó la presencia del receptor de tipo GHS-R1a en algunas de las células basales de la mucosa intestinal que expresan cada uno de los tres transportadores de glucosa estudiados (**Figura 20**). Concretamente, en un 37,5% de células GLUT2+, en un 25% de células SGLT1+ y en un 33,3% de células SGLT2+.

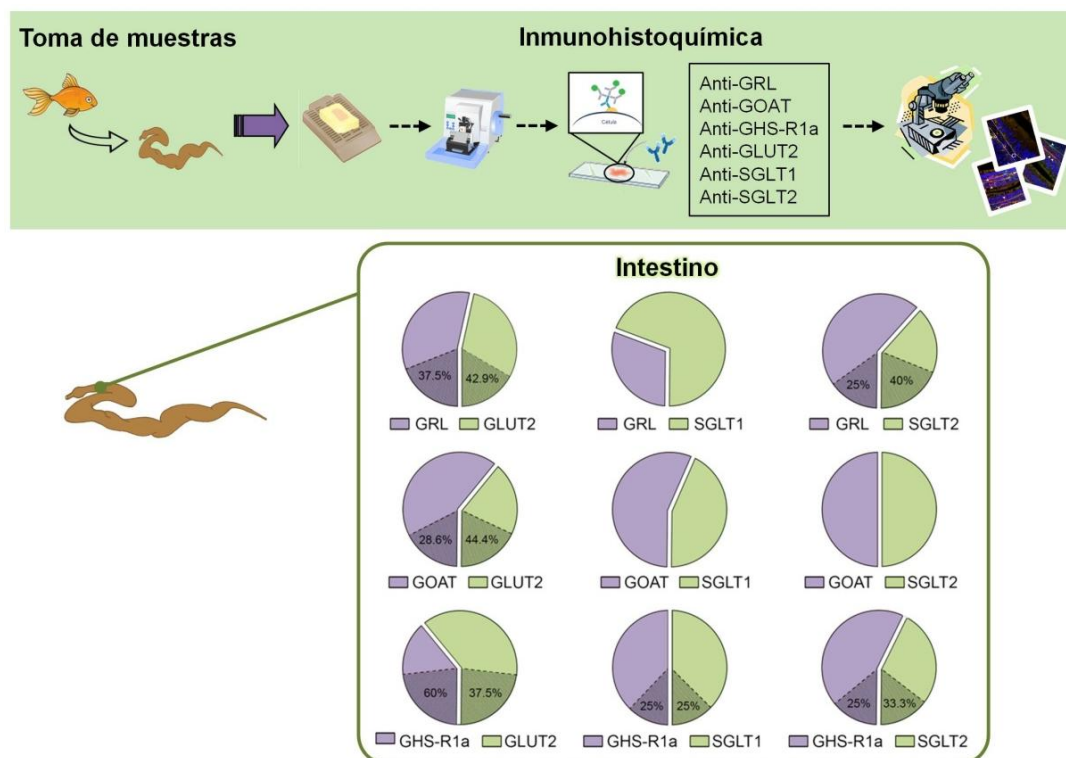


Figura 20. Procedimiento y resultados obtenidos en las tinciones inmunohistoquímicas realizadas para analizar la posible colocalización de GRL/GOAT/GHS-R1a y GLUT2/SGLT1/SGLT2 en el intestino del carpín. La parte superior muestra el procedimiento y la parte inferior los resultados esquematizados. Cada gráfico circular indica la abundancia relativa de GRL/GOAT/GHS-R1a (■) y de GLUT2/SGLT1/SGLT2 (■) en las células intestinales. El área sombreada de los círculos representa el porcentaje de células que localizan las dos proteínas estudiadas en cada caso. GHS-R1a, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento de tipo 1a; GLUT2, transportador de glucosa por difusión facilitada de tipo 2; GOAT, ghrelina O-aciltransferasa; GRL, ghrelina; SGLT1, cotransportador sodio-glucosa de tipo 1; SGLT2, cotransportador sodio-glucosa de tipo 2.

La primera aproximación para abordar el estudio de la posible relación entre la glucosa y el sistema ghrelinérgico en el carpín implicó una serie de experimentos *in vivo*. En un primer experimento, estudiamos los efectos de la administración intraperitoneal de glucosa sobre los niveles circulantes de ghrelina acilada y la expresión génica de *preproghrelina*, *goat* y *ghs-r1* en intestino. Los resultados obtenidos muestran que todos los parámetros analizados incrementan significativamente con la administración de glucosa a los 30, 60 y 120 min post-inyección (excepto los niveles circulantes a 120 min; **Figura 21A**). En un segundo experimento, se procedió a la inyección intraperitoneal de ghrelina acilada y la posterior determinación de los niveles circulantes de glucosa y de la expresión génica intestinal de los transportadores de glucosa a los 30, 60 y 120 min post-inyección. Observamos que la ghrelina disminuye significativamente los niveles de glucosa en sangre a los 120 minutos de la inyección, a la vez que incrementa los niveles intestinales de transcritos de *glut2*, *sglt1* y *sglt2* en función del tiempo (**Figura 21B**). A fin de corroborar esta acción estimuladora de la

ghrelina sobre la expresión de transportadores de glucosa a nivel intestinal, realizamos un cultivo *in vitro* de explantes de intestino expuestos a diferentes concentraciones de ghrelina. Observamos que la ghrelina induce la expresión génica de *sgl1* a 30, 60 y 120 minutos post-incubación, y de *glut2* y *sgl2* a 120 minutos en los explantes de intestino. Además, la ghrelina también aumentó la cantidad de proteína de los tres tipos de transportadores (Figura 22A).

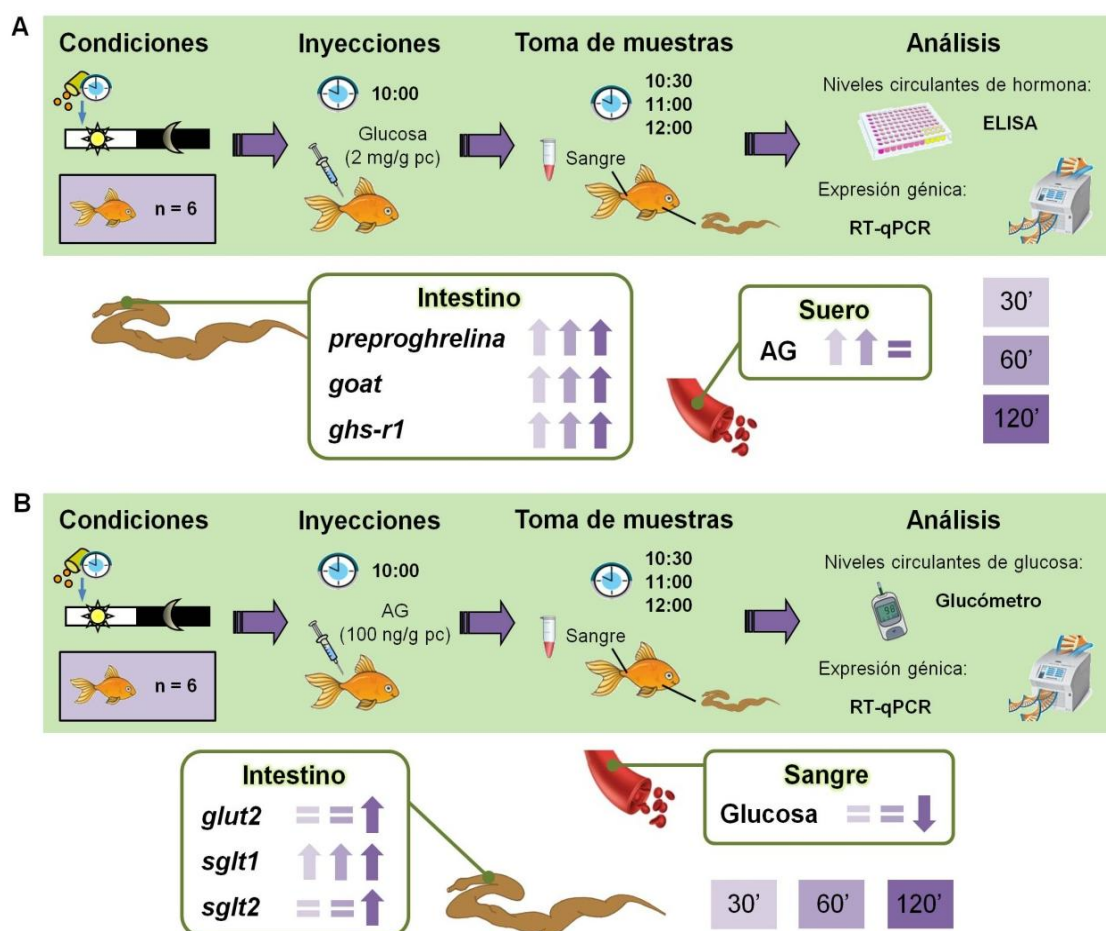


Figura 21. Diseños experimentales y principales resultados obtenidos en el estudio *in vivo* de los efectos de la administración de glucosa sobre el sistema ghrelinérgico (A) y de la administración de ghrelina sobre transportadores de glucosa (B) en el carpín. La parte superior de cada subfigura muestra los diseños experimentales y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles génicos y/o proteicos no modificados, ↑: niveles incrementados, ↓: niveles reducidos. AG, ghrelina acilada; GHS-R1, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento de tipo 1; GLUT2, transportador de glucosa por difusión facilitada de tipo 2; GOAT, ghrelina O-aciltransferasa; SGLT1, cotransportador sodio-glucosa de tipo 1; SGLT2, cotransportador sodio-glucosa de tipo 2.

Para profundizar en los mecanismos intracelulares subyacentes a las acciones de la ghrelina en la expresión de los transportadores de glucosa, se midió la expresión de cada uno de los transportadores en muestras de intestino preincubadas en presencia del antagonista del receptor GHS-R1a ([D-Lys³]-GHRP-6), del inhibidor de la PLC (U73122) o del inhibidor

de la PKA (H89) previamente al tratamiento con ghrelina, de manera similar al estudio realizado en el apartado 3.1.1. Los resultados obtenidos muestran que la preincubación con [D-Lys³]-GHRP-6 contrarresta los incrementos de expresión de *glut2*, *sglt1* y *sglt2* inducidos por ghrelina, indicando nuevamente que las acciones de la ghrelina que estamos observando son específicas y están mediadas por su receptor GHS-R1a (**Figura 22B**). El hecho de que el inhibidor de la PKC bloquee totalmente la inducción de la expresión de *glut2*, *sglt1* y *sglt2* estimulada por ghrelina, pero no así el inhibidor de la PKA (**Figura 22B**), sugiere que en estos efectos de la ghrelina induciendo la expresión de transportadores de glucosa en el intestino mediados por el receptor GHS-R1a, interviene fundamentalmente la vía de la PLC/PKC/IP₃.

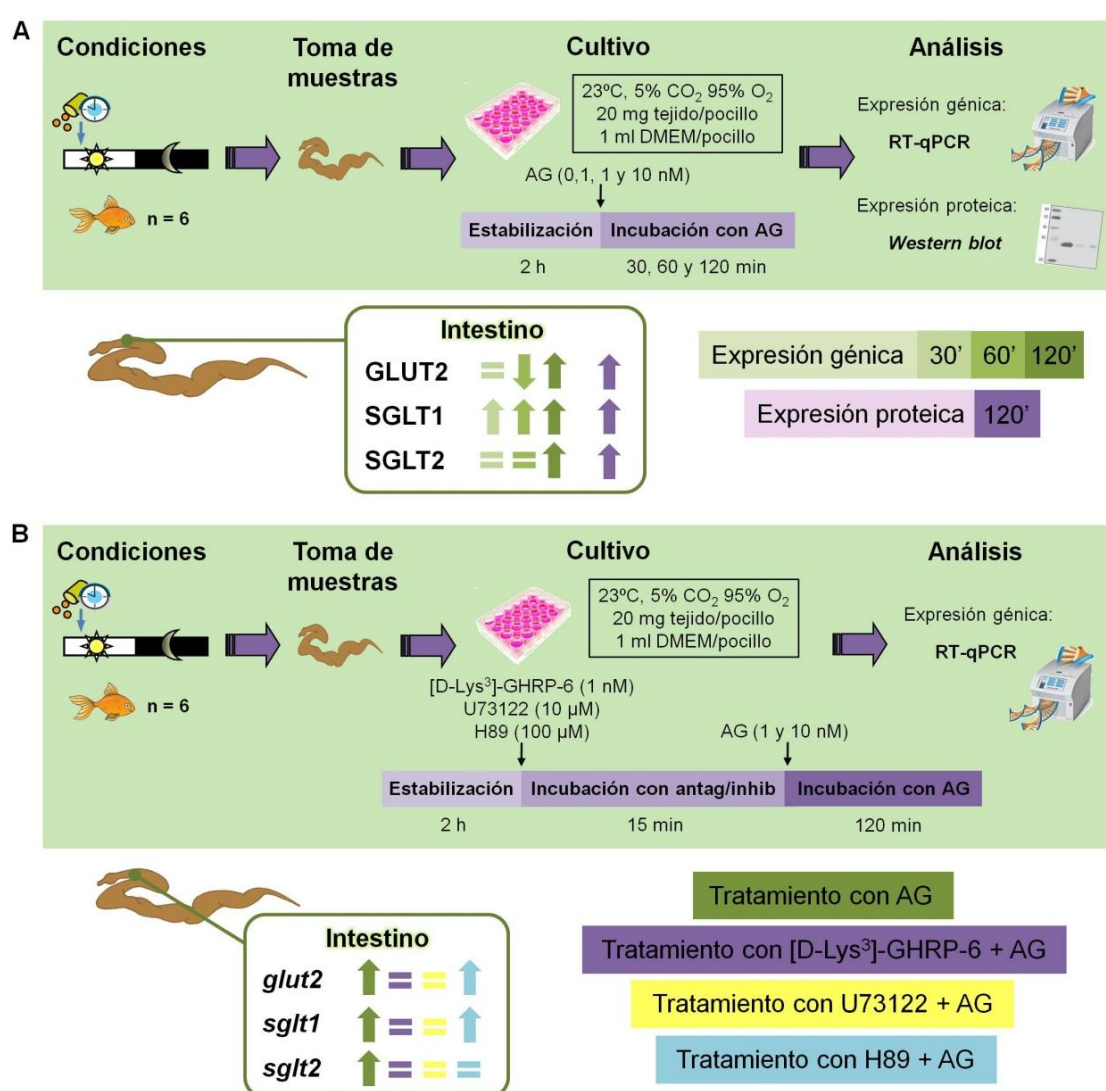


Figura 22. Diseños experimentales y principales resultados obtenidos en el estudio *in vitro* de los efectos de ghrelina sobre transportadores de glucosa en el carpín. A. Efectos concentración- y tiempo-dependientes de ghrelina sobre transportadores de glucosa. B. Tipo de receptor y vías de señalización intracelular implicadas. La parte superior de cada subfigura muestra los diseños experimentales y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles génicos y/o proteicos no modificados,

↑ : niveles incrementados, ↓ : niveles reducidos. [D-Lys³]-GHRP-6, péptido liberador de hormona de crecimiento 6 [D-Lys³]; AG, ghrelina acilada; GLUT2, transportador de glucosa por difusión facilitada de tipo 2; H89, inhibidor de la PKA; SGLT1, cotransportador sodio-glucosa de tipo 1; SGLT2, cotransportador sodio-glucosa de tipo 2; U73122, inhibidor de la PLC.

Teniendo presente que los transportadores de glucosa se encuentran en gran proporción almacenados en el interior de vesículas intracelulares que, ante la presencia de glucosa en el medio extracelular, son translocados hacia la membrana plasmática para permitir una mayor entrada de glucosa al interior de la célula, nos planteamos estudiar, por último, si la ghrelina, además de incrementar la expresión de los transportadores de glucosa, puede modular su translocación a la membrana plasmática. Para investigar esta cuestión, hemos recurrido a una aproximación *in vitro* empleando un cultivo primario de células intestinales de carpín. Para ello hemos aislado células intestinales de varios ejemplares de peces y hemos procedido a su cultivo en placa. Tras monitorizar su crecimiento y observar que hayan alcanzado un grado suficiente de confluencia, las células han sido tratadas (o no, grupo control) con ghrelina (10 nM) durante 30, 60 y 120 minutos, procediendo a determinar los niveles de GLUT2, SGLT1 y SGLT2 presentes en la membrana plasmática mediante una técnica inmunoquímica (véanse los detalles en el Anexo metodológico III). Los resultados obtenidos han demostrado que la cantidad de GLUT2 presente en la superficie de las células intestinales incrementa significativamente tras 30 minutos de exposición a ghrelina, sin efectos a tiempos de exposición más largos. La ghrelina no provocó ningún efecto en la tasa de translocación de SGLT1 y SGLT2 en ninguno de los tiempos ensayados (**Figura 23**).

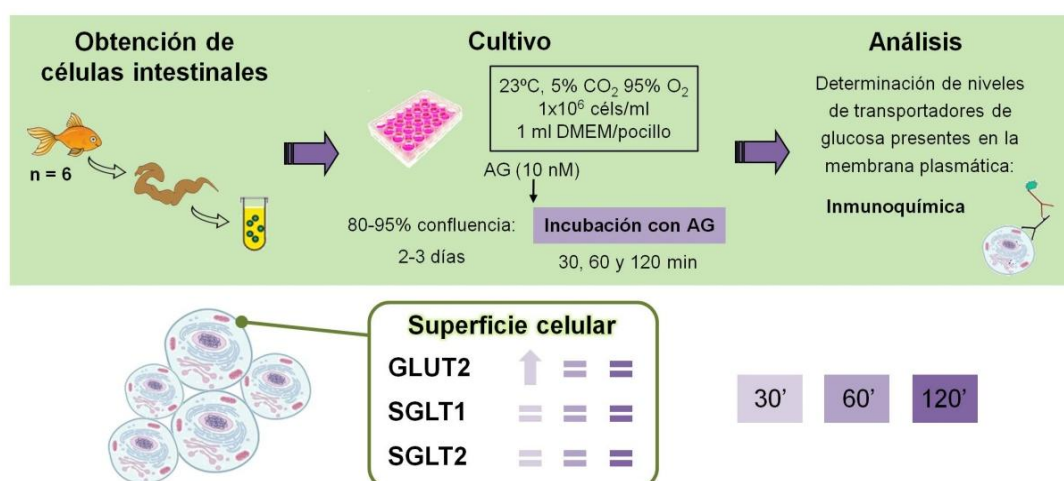


Figura 23. Diseño experimental y resultados obtenidos en el estudio de los efectos de ghrelina sobre la translocación de transportadores de glucosa en cultivo primario de células intestinales de carpín. La parte superior muestra el diseño experimental y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles proteicos no modificados, ↑ : niveles incrementados, ↓ : niveles reducidos. AG, ghrelina acilada; GLUT2, transportador de glucosa por difusión facilitada de tipo 2; SGLT1, cotransportador sodio-glucosa de tipo 1; SGLT2, cotransportador sodio-glucosa de tipo 2.

En resumen, los estudios de este bloque experimental demuestran, por primera vez en los vertebrados, un importante papel estimulador de la ghrelina sobre la expresión de los transportadores de glucosa intestinales, así como en la activación de mecanismos de translocación de los mismos hacia la membrana plasmática de las células intestinales. Estos hallazgos aportan novedosa información a favor de que el transporte intestinal de glucosa en los peces puede estar modulado de forma paracrina/autocrina por hormonas gastrointestinales, al menos por la ghrelina.

3. La ghrelina como moduladora de otras hormonas entéricas

En este apartado nos planteamos conocer si la ghrelina (como la hormona de origen periférico con carácter orexigénico más potente) interactúa con otros péptidos entéricos (como la CCK, el PYY y el GLP-1) en la regulación de la ingesta en los peces. Nuestra primera aproximación fue estudiar la localización anatómica de estos péptidos y del receptor GHS-R1a en el intestino del carpín utilizando técnicas inmunohistoquímicas. Los resultados (**Figura 24**) mostraron que aproximadamente el 75% de las células enteroendocrinas inmunorreactivas a ghrelina también son positivas para CCK, PYY y/o GLP-1, sugiriendo que un gran número de células productoras de ghrelina en el intestino del carpín también son capaces de sintetizar, al menos, una de estas otras hormonas. Además, observamos que alrededor del 30% de las células inmunorreactivas a CCK, PYY y GLP-1 también expresan GHS-R1a (**Figura 24**), lo que indica que una subpoblación de células productoras de cada una de estas hormonas anorexigénicas es susceptible de una modulación por ghrelina.

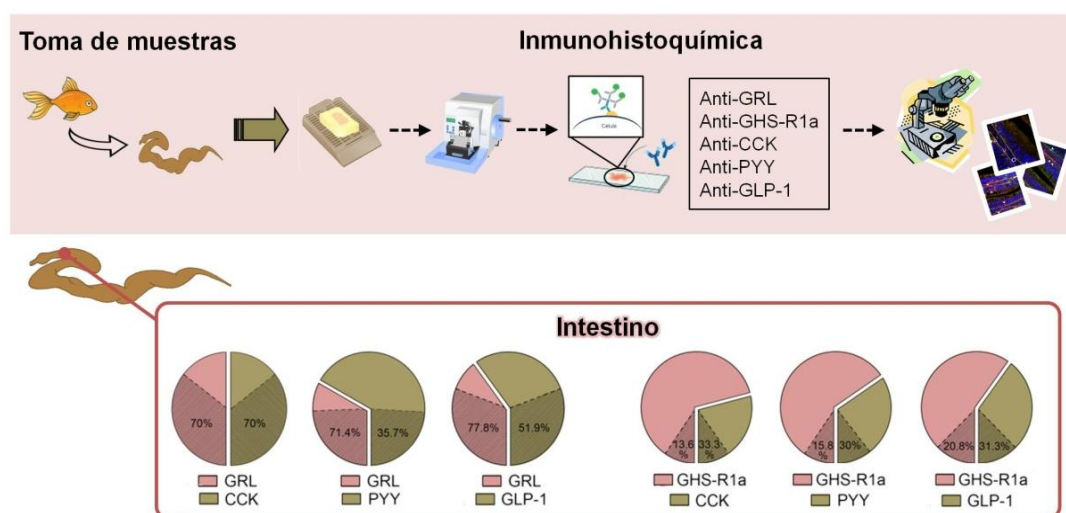


Figura 24. Procedimiento y resultados obtenidos en las tinciones inmunohistoquímicas realizadas para analizar la posible colocalización de GRL/GHS-R1a y CCK/PYY/GLP-1 en el intestino del carpín. La parte superior muestra el procedimiento y la parte inferior los resultados esquematizados. Cada gráfico circular indica la abundancia relativa de GRL/GHS-R1a (■) y de CCK/PYY/GLP-1 (■) en las células intestinales. El área sombreada de los círculos representa el porcentaje de células que

localizan las dos proteínas estudiadas en cada caso. CCK, colecistocinina; GHS-R1a, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento de tipo 1a; GLP-1, péptido análogo a glucagón-1; GRL, ghrelina; PYY, péptido tirosina-tirosina.

A continuación, estudiamos la posible modulación *in vitro* por ghrelina de la expresión génica y proteica de CCK, PYY y GLP-1 en el intestino del carpín. Para ello, se realizó un cultivo de explantes primarios de intestino expuestos (o no, grupo control) a diferentes concentraciones de ghrelina acilada, de manera similar a lo descrito en los apartados anteriores. Nuestros resultados demuestran que 60 minutos de exposición a ghrelina provoca una disminución significativa en los niveles intestinales de *prepro-CCK*, *prepro-PYY* y *proglucagón*, así como de PYY y GLP-1 (**Figura 25A**). Al igual que en los experimentos anteriores, un cultivo empleando el antagonista [D-Lys³]-GHRP-6 revela que la preincubación de explantes intestinales con dicho fármaco contrarresta la disminución en la expresión de *prepro-CCK* y *prepro-PYY* inducida por ghrelina, aunque no la de *proglucagón*, sugiriendo la implicación de dicho receptor en al menos una parte importante de las acciones de la ghrelina modulando otras hormonas entéricas (**Figura 25B**).

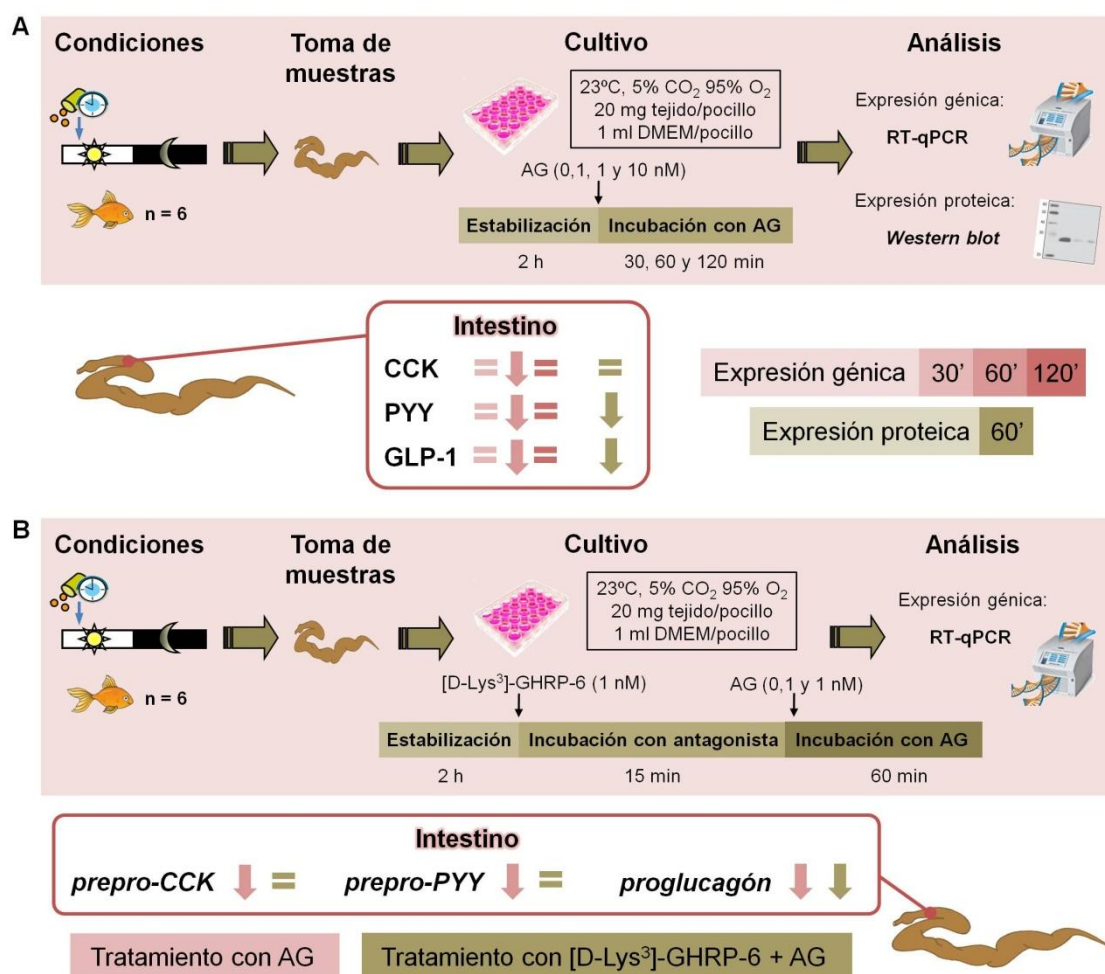


Figura 25. Diseños experimentales y principales resultados obtenidos en el estudio *in vitro* de los efectos de ghrelina sobre ciertas hormonas entéricas en el carpín. A. Efectos concentración- y tiempo-

dependientes de ghrelina sobre hormonas entéricas. B. Implicación del receptor GHS-R1a. La parte superior de cada subfigura muestra los diseños experimentales y la parte inferior los resultados esquematizados. =: niveles génicos y/o proteicos no modificados, ↑: niveles incrementados, ↓: niveles reducidos. [D-Lys³]-GHRP-6, péptido liberador de hormona de crecimiento 6 [D-Lys³]; AG, ghrelina acilada; CCK, colecistocinina; GLP-1, péptido análogo a glucagón-1; PYY, péptido tirosina-tirosina.

En último lugar, hemos estudiado las interacciones *in vivo* entre la ghrelina y ciertas hormonas entéricas anorexigénicas en la regulación de la ingesta de alimentos mediante la administración intraperitoneal simultánea de ghrelina y cada una de dichas hormonas, cuantificando la ingesta una hora después de las inyecciones. Los resultados de este estudio se muestran en la **Figura 26**. La administración periférica de ghrelina (100 ng/g de peso corporal) aumentó significativamente la ingestión de alimentos, mientras que CCK, PYY y GLP-1 la disminuyeron en comparación con el grupo de peces control. Además, cuando se inyectaron conjuntamente CCK o GLP-1 con ghrelina, los valores de ingesta resultaron similares a los del grupo control, pero la administración simultánea de ghrelina y PYY resultó en una disminución significativa de la ingestión de alimentos. Esto nos permite deducir que la acción anorexigénica de CCK y GLP-1 parece tener una potencia similar a la acción orexigénica de la ghrelina en el carpín, mientras que la potencia anorexigénica del PYY es mayor que la acción orexigénica de la ghrelina.

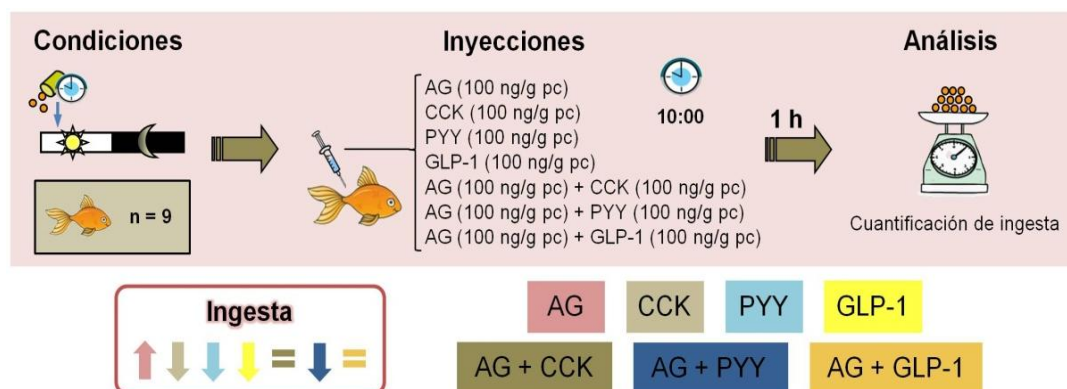


Figura 26. Diseño experimental y resultados obtenidos en el estudio *in vivo* de los efectos de la co-administración de ghrelina y otras hormonas entéricas en la ingesta del carpín. La parte superior muestra el diseño experimental y la parte inferior los resultados esquematizados. Se indica el resultado de la cuantificación de los niveles de ingesta tras la administración de las diferentes hormonas respecto al grupo control. =: niveles no modificados, ↑: niveles incrementados, ↓: niveles reducidos. AG, ghrelina acilada; CCK, colecistocinina; GLP-1, péptido análogo a glucagón-1; PYY, péptido tirosina-tirosina.

En resumen, los estudios presentados en este apartado demuestran la colocación de la ghrelina y su receptor GHS-R1a con CCK, PYY y GLP-1 en algunas células del intestino del carpín, con una acción inhibitoria de la ghrelina sobre la expresión local de estos tres

péptidos. Estos resultados sugieren que la ghrelina podría estar mediando su acción orexigénica a través de la supresión de señales intestinales inhibitoras del apetito, particularmente de CCK, PYY y GLP-1.

Como conclusión general del Capítulo 3, la experimentación realizada aporta relevante información relativa a acciones endocrinas/paracrinas/autocrinas de la ghrelina sobre funciones digestivas y la regulación de la ingesta en el carpín. Los hallazgos en él incluidos han permitido conocer diversos aspectos importantes sobre la funcionalidad del sistema ghrelinérgico en los peces. Todos estos resultados forman parte de tres artículos científicos que se presentan a continuación:

- Blanco AM, Bertucci JI, Sánchez-Bretaña A, Delgado MJ, Valenciano AI, Unniappan S (2017) Ghrelin modulates gene and protein expression of digestive enzymes in the intestine and hepatopancreas of goldfish (*Carassius auratus*) via the GHS-R1a: possible roles of PLC/PKC and AC/PKA intracellular signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 442: 165-181.
- Blanco AM, Bertucci JI, Ramesh N, Delgado MJ, Valenciano AI, Unniappan S (2017) Ghrelin facilitates GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-mediated intestinal glucose transport in goldfish (*Carassius auratus*). *Sci Rep* 7: 45024.
- Blanco AM, Bertucci JI, Valenciano AI, Delgado MJ, Unniappan S (2017) Ghrelin suppresses cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the intestine, and attenuates the anorectic effects of CCK, PYY and GLP-1 in goldfish (*Carassius auratus*). *Horm Behav* (Under review).



Ghrelin modulates gene and protein expression of digestive enzymes in the intestine and hepatopancreas of goldfish (*Carassius auratus*) via the GHS-R1a: Possible roles of PLC/PKC and AC/PKA intracellular signaling pathways

Ayelen Melisa Blanco^{a, b}, Juan Ignacio Bertucci^{a, c}, Aída Sánchez-Breñaño^d,
María Jesús Delgado^b, Ana Isabel Valenciano^b, Suraj Unniappan^{a, *}

^a Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Department of Veterinary Biomedical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, S7N 5B4 Saskatoon, Saskatchewan, Canada

^b Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Nováis 12, 28040 Madrid, Spain

^c Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús, Avenida Intendente Marinos Km. 8,2, 7130 Chascomús, Buenos Aires, Argentina

^d Department of Pharmacology and Toxicology, and Neuroscience Institute, Morehouse School of Medicine, 720 Westview Drive, GA 30310 Atlanta, GA, United States

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 September 2016

Received in revised form

28 December 2016

Accepted 28 December 2016

Available online 29 December 2016

Keywords:

Fish

Ghrelin

Sucrase-isomaltase

Aminopeptidase

Trypsin

Lipoprotein lipase

ABSTRACT

Ghrelin, a multifunctional gut-brain hormone, is involved in the regulation of gastric functions in mammals. This study aimed to determine whether ghrelin modulates digestive enzymes in goldfish (*Carassius auratus*). Immunofluorescence microscopy found colocalization of ghrelin, GHS-R1a and the digestive enzymes sucrase-isomaltase, aminopeptidase A, trypsin and lipoprotein lipase in intestinal and hepatopancreatic cells. *In vitro* ghrelin treatment in intestinal and hepatopancreas explant culture led to a concentration- and time-dependent modulation (mainly stimulatory) of most of the digestive enzymes tested. The ghrelin-induced upregulations of digestive enzyme expression were all abolished by pre-incubation with the GHS-R1a ghrelin receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6, and most of them by the phospholipase C inhibitor U73122 or the protein kinase A inhibitor H89. This indicates that ghrelin effects on digestive enzymes are mediated by GHS-R1a, partly by triggering the PLC/PKC and AC/PKA intracellular signaling pathways. These data suggest a role for ghrelin on digestive processes in fish.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: AC, Adenylyl cyclase; AgRP, Agouti-related peptide; AMPK, AMP-activated protein kinase; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; [D-Lys3]-GHRP-6, [D-Lys3]-Growth hormone releasing peptide-6; GH, Growth hormone; GHS-R, Growth hormone secretagogue receptor; GOAT, Ghrelin O-acyl transferase; GRL, Ghrelin; IHC, Immunohistochemistry; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; mTOR, Mechanistic target of rapamycin; NPY, Neuropeptide Y; OD, Optical density; PBS, Phosphate-buffered saline; PFA, Paraformaldehyde; PKA, Protein kinase A; PKC, Protein kinase C; PLC, Phospholipase C; RT-qPCR, Real-time quantitative PCR.

* Corresponding author.

E-mail addresses: ayelenmelisablanca@ucm.es (A.M. Blanco), jburtucci@intech.gov.ar (J.I. Bertucci), asanchez@msm.edu (A. Sánchez-Breñaño), mjdelgad@bio.ucm.es (M.J. Delgado), aivalenciano@bio.ucm.es (A.I. Valenciano), suraj.unniappan@usask.ca (S. Unniappan).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.027>

0303-7207/© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ghrelin is a peptide hormone originally discovered from the rat stomach (Kojima et al., 1999). It is typically found as a 28-amino acid peptide in mammals, but several different isoforms were reported in many animals, especially non-mammalian vertebrates. In goldfish (*Carassius auratus*), 11 molecular forms of ghrelin consisting of 14-, 17-, 18- or 19- amino acid residues were identified (Miura et al., 2009). Stomach is the major tissue source of circulating ghrelin, although the endocrine pancreas, kidney, pituitary and hypothalamus also contribute to the ghrelin pool (Date et al., 2000; Gnanapavan et al., 2002; Kojima et al., 1999; Mori et al., 2000; Wierup et al., 2002). A unique aspect of this hormone is the presence of a post-translational acyl modification, essential for its activation, which is catalysed by ghrelin O-acyl transferase (GOAT)

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Ghrelin Facilitates GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-mediated Intestinal Glucose Transport in Goldfish (*Carassius auratus*)

Received: 30 September 2016

Accepted: 17 February 2017

Published: 24 March 2017

Ayelén Melisa Blanco^{1,2}, Juan Ignacio Bertucci^{2,3}, Naresh Ramesh², María Jesús Delgado¹, Ana Isabel Valenciano¹ & Suraj Unniappan²

Glucose homeostasis is an important biological process that involves a variety of regulatory mechanisms. This study aimed to determine whether ghrelin, a multifunctional gut-brain hormone, modulates intestinal glucose transport in goldfish (*Carassius auratus*). Three intestinal glucose transporters, the facilitative glucose transporter 2 (GLUT2), and the sodium/glucose co-transporters 1 (SGLT1) and 2 (SGLT2), were studied. Immunostaining of intestinal sections found colocalization of ghrelin and GLUT2 and SGLT2 in mucosal cells. Some cells containing GLUT2, SGLT1 and SGLT2 coexpressed the ghrelin/growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a). Intraperitoneal glucose administration led to a significant increase in serum ghrelin levels, as well as an upregulation of intestinal *preproghrelin*, *ghrelin O-acyltransferase* and *ghs-r1* expression. *In vivo* and *in vitro* ghrelin treatment caused a concentration- and time-dependent modulation (mainly stimulatory) of GLUT2, SGLT1 and SGLT2. These effects were abolished by the GHS-R1a antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 and the phospholipase C inhibitor U73122, suggesting that ghrelin actions on glucose transporters are mediated by GHS-R1a *via* the PLC/PKC signaling pathway. Finally, ghrelin stimulated the translocation of GLUT2 into the plasma membrane of goldfish primary intestinal cells. Overall, data reported here indicate an important role for ghrelin in the modulation of glucoregulatory machinery and glucose homeostasis in fish.

Glucose is a critical source of energy for most physiological processes, especially the functioning of brain. Circulating glucose comes mainly from the diet during the fed state, and from gluconeogenesis and glycogenolysis during fasting¹. Diet-derived glucose is absorbed by enterocytes through specific glucose transporters or carriers. These transporters are classified into two families: facilitative glucose carriers (GLUTs), through which glucose is transported by facilitated diffusion, and sodium/glucose co-transporters (SGLTs), which co-transport Na⁺ and glucose by an electrochemical gradient across the membrane². The classical model of glucose absorption through the intestine in mammals indicates that SGLT1 transports glucose from the intestinal lumen to the cytosol of enterocytes³, whereas GLUT2 is in charge of transporting glucose from cytosol to the blood^{3,4}. Additionally, after high luminal glucose, GLUT2 is usually translocated from intracellular vesicles into the apical membrane, allowing bulk absorption of glucose^{5,6}. GLUT2 and SGLT1 have been also proposed to function as glucose sensors in the intestine and other tissues of mammals³. Apart from these two transporters, the presence of small quantities of SGLT2 was detected in the rat intestine⁷, suggesting that this transporter (primarily involved in glucose uptake in the kidney) might also participate in glucose transport across the intestinal walls.

In fish, the mechanisms of carbohydrate absorption are believed to be very similar to those described in mammals. Thus, the entry of glucose across the brush-border membrane of the fish intestinal cells is SGLT1-driven^{8–10}, whereas a Na⁺-independent, facilitated carrier mediates glucose transport across the basolateral membrane to the blood^{9,11,12}. The presence of GLUT2 in the intestine of several fishes^{13,14} suggests that this member of the

¹Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ²Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Department of Veterinary Biomedical Sciences, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. ³Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús, Buenos Aires, Argentina. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.U. (email: suraj.unniappan@usask.ca)

GLUT family is such a facilitated carrier, although the precise location of this transporter within the enterocytes is yet to be investigated. As in mammals, both GLUT2 and SGLT1 were demonstrated to have glucosensory properties in fish^{15,16}. Fish exhibit a wide range of natural feeding habits and consume herbivorous, carnivorous and omnivorous diets. These diverse feed composition determine different capabilities of the intestinal uptake process and hence different glucose absorption rates depending on the species^{9,17–19}.

Intestinal glucose absorption, and glucose metabolism in general, is subjected to a strict endocrine control that acts to keep blood glucose levels in a narrow range. Classical glucoregulatory hormones include the pancreas-derived insulin and glucagon, and the intestinal glucagon-like peptide 1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP)^{20,21}. However, other newer hormones have been involved in the regulation of glucose homeostasis. One of them is ghrelin, a peptide hormone mainly synthesized by the stomach and/or the foregut^{22,23}. Ghrelin is particularly important for being the only peripheral protein known to be posttranslationally modified by an acylation. This modification that is essential for ghrelin activity is catalysed by ghrelin O-acyl transferase (GOAT)^{24,25}. Besides, it is the only peripheral peptide with a stimulatory (orexigenic) role in food intake in both mammals²⁶ and fish²⁷.

The role of ghrelin in glucose metabolism, in mammals, is mainly associated with an elevation in blood glucose levels due to a decrease in insulin secretion, exerting thus an insulino-static action^{28,29}. In terms of glucose transport, ghrelin has been reported to reduce both GLUT2 levels and the glucose uptake in primary astrocytes from rat hypothalamus³⁰, to increase insulin-induced glucose uptake in isolated rat white adipocytes³¹, and to enhance GLUT4 mRNA expression in rat cultured myocytes³². In fish, the involvement of ghrelin in the regulation of glucose metabolism has been less explored, but it is suggested that this peptide regulates carbohydrate metabolism via insulin inhibition and glucagon stimulation in zebrafish³³. Additionally, ghrelin was reported to increase GLUT2 levels in rainbow trout hypothalamus and hindbrain³⁴. Overall, there are few studies in mammals and fish showing a connection between ghrelin and glucose transport regulation in locations different to the intestine, but no reports are available on ghrelin and intestinal glucose transport.

Ghrelin actions are mediated by G-protein coupled receptors known as growth hormone secretagogue receptors (GHS-R), or ghrelin receptors^{22,35}. Different subtypes of ghrelin receptors have been described in mammals and fish^{36,37}, among which GHS-R1a seems to be the one mediating most physiological functions of ghrelin^{37–39}. This receptor predominantly triggers the phospholipase C (PLC)/protein kinase C (PKC) and/or the adenylyl cyclase (AC)/protein kinase A (PKA) intracellular pathways for signal transduction^{39–41}. Nevertheless, other molecular pathways, including the AMP-activated protein kinase (AMPK)⁴², the mitogen-activated protein kinase (MAPK)^{43,44} and the mechanistic target of rapamycin (mTOR)⁴⁵ pathways, have been also associated to actions mediated by GHS-R1a.

In the present study, we aimed to characterize possible interactions between the ghrelinergic system and the machinery involved in glucose absorption in fish, using goldfish (*Carassius auratus*) as animal model. Very recently we found that ghrelin is likely helping carbohydrate digestion by increasing the glucosidase enzyme sucrase-isomaltase (Blanco *et al.*, *under review*). Here we evaluated whether ghrelin modulates intestinal glucose transport, thus trying to elucidate a possible role for this hormone in carbohydrate absorption. It is particularly important to better understand the mechanisms underlying glucose metabolism and utilization in fish, as many species are known to show a poor ability to utilize dietary carbohydrates⁴⁶. Given this importance, numerous studies have been published characterizing glucose metabolism and glucose sensing in fishes^{9,16}. To achieve our purpose, we first characterized the cellular localization of glucose transporters GLUT2, SGLT1 and SGLT2 in relation to ghrelin, GOAT and GHS-R1a within the goldfish intestine. Then, we studied whether the ghrelinergic system is modulated by glucose, by characterizing the expression of mRNAs encoding ghrelin, GHS-R1a and GOAT after glucose administration. Does ghrelin affect glucose transporters in goldfish intestine? For this we used a double approximation, testing the effects of ghrelin treatment on the intestinal expression (mRNA and/or protein) of GLUT2, SGLT1 and SGLT2 both *in vivo* and *in vitro*. The results obtained indicate that ghrelin, in a time- and concentration-dependent manner, stimulates the expression of GLUT2, SGLT1 and SGLT2. We then investigated whether GHS-R1a is mediating such effects, and the possible implication of the PLC/PKC and AC/PKA intracellular signal transduction pathways. Finally, using a primary culture of goldfish intestinal cells, we studied if the effects of ghrelin on intestinal glucose transporters include a modulation of their translocation rate into the plasma membrane. The information gained is of great importance for better understanding the physiological actions of the ghrelinergic and glucoregulatory systems in fish.

Results

The glucose transporters GLUT2, SGLT1 and SGLT2 are present in the goldfish intestine.

Immunostaining of goldfish intestinal sections revealed the presence of round or elongated GLUT2-like (green; Figs 1a and 2a,g,m, Supplementary Figs S1–S3), SGLT1-like (green; Figs 1b and 2b,h,n, Supplementary Figs S1–S3) and SGLT2-like (green; Figs 1c and 2c,i,o, Supplementary Figs S1–S3) cells in the villi. The great majority of the cells immunopositive for each of the transporters was observed along the border of the mucosa, adjacent to the lamina propria. A few GLUT2-like and SGLT1-like positive cells were also observed dispersed in the submucosa. Finally, a small population of SGLT1-like cells was detected in the brush border of the mucosa. Quantification of immunoreactive cells demonstrated that GLUT2-like cells are the most abundant (51.5%) of the three glucose transporters studied, followed by SGLT1-like cells (30.8%) and SGLT2-like cells (17.7%) (Fig. 1d). Apart from the mentioned bright and discrete cells, intestine immunostaining also revealed a broad faint signal in the apical membrane for SGLT1, and, to a lesser extent, for GLUT2 (Fig. 1a,b).

Ghrelin, GOAT and GHS-R1a colocalize GLUT2, SGLT1 and/or SGLT2 in the goldfish intestine.

Ghrelin-like (red; Fig. 2a–c, Supplementary Fig. S1), GOAT-like (red; Fig. 2g–i, Supplementary Fig. S2) and GHS-R1a (red; Fig. 2m–o, Supplementary Fig. S3) immunopositive cells were found scattered in the goldfish

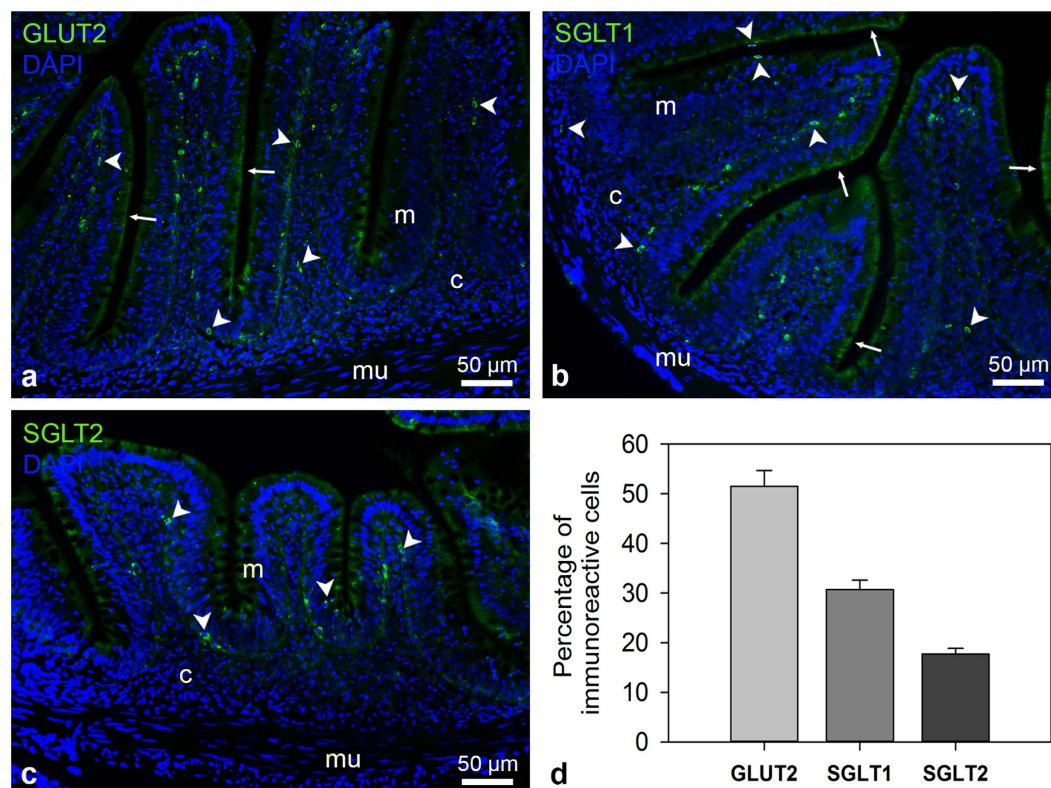


Figure 1. GLUT2-like, SGLT1-like and SGLT2-like immunoreactivity in goldfish intestine detected by immunohistochemistry. (a–c) Representative transverse sections of intestine showing GLUT2-like (a; green), SGLT1-like (b; green) or SGLT2-like (c; green) immunoreactivity. All images are merged with DAPI showing nuclei in blue. Arrowheads (▶) indicate immunoreactive cells and solid thin arrows (→) point glucose transporter labeling in the apical membrane. Scale bars (μm) are indicated in each image. c, connective tissue (lamina propria + submucosa); m, mucosa; mu, muscular layer. Images were captured using a Nikon Eclipse Ti-Inverted fluorescence microscope. (d) Relative abundance of GLUT2, SGLT1 and SGLT2 positive cells in the intestine of goldfish. Data are presented as media percentage + SEM of each population of cells in three different sections. For details on methods employed for percentage calculation, please consult the *Methods* section.

intestinal mucosa, adjacent to the lamina propria. A small proportion of submucosal cells also showed ghrelin-like (Fig. 2a, Supplementary Fig. S1), GOAT-like (Fig. 2g,h, Supplementary Fig. S2) and GHS-R1a-like (Fig. 2n, Supplementary Fig. S3) immunoreactivity. Ghrelin-like cells were almost equal in number to GLUT2-like cells (Fig. 2d), but considerably less abundant than SGLT1-like cells (Fig. 2e) and more widespread than SGLT2-like cells (Fig. 2f). The relative abundance of cells immunopositive for GOAT and SGLT2 was similar, but GOAT-like cells were greater in number in comparison to GLUT2-like and SGLT1-like cells (Fig. 2j–l). Finally, the relative number of GHS-R1a-like cells was higher, similar and lesser in comparison to GLUT2-like, SGLT1-like and SGLT2-like cells, respectively (Fig. 2p–r).

Fluorescence double staining showed the colocalization of ghrelin-like and GLUT2-like (yellow; Fig. 2a; Supplementary Fig. S1) and SGLT2-like (yellow; Fig. 2c; Supplementary Fig. S1) in a few mucosal cells. Specifically, 37.5% and 25% of the ghrelin-like cells coexpressed GLUT2 and SGLT2, respectively (Fig. 2d,f). No cells coexpressing ghrelin and SGLT1 were detected (Fig. 2b; Supplementary Fig. S1). GOAT-like immunoreactive cells were found to overlap with GLUT2 (yellow; Fig. 2g; Supplementary Fig. S2), but not SGLT1 (Fig. 2h; Supplementary Fig. S2) and SGLT2 (Fig. 2i; Supplementary Fig. S2), in some cells of the mucosa (28.6% of GOAT-like cells and 44.4% of GLUT2-like cells; Fig. 2j–l). Finally, GHS-R1a-like cells were found to colocalize with cells containing the three glucose transporters studied. These cells were also restricted to basal mucosal cells adjacent to the submucosa layer (yellow; Fig. 2m–o; Supplementary Fig. S3). Quantification demonstrated that 37.5% of the GLUT2-like, 25% of the SGLT1-like and 33.3% of the SGLT2-like immunoreactive cells coexpressed GHS-R1a (Fig. 2p–r). In all negative control immunostainings performed, no signal was detected in the slides treated only with secondary antibodies (Supplementary Fig. S4).

Glucose upregulates the ghrelinergic system in goldfish intestine *in vivo*. Intraperitoneal (ip) administration of glucose in goldfish caused a significant increase in serum acylated ghrelin levels at 30 and 60 min, but not at 120 min, when compared to the saline-injected groups. The magnitude of the increases was of around 1.5- and 1.7-fold, respectively (Fig. 3a). The expression of *preproghrelin*, *goat* and *ghs-r1* mRNAs in the

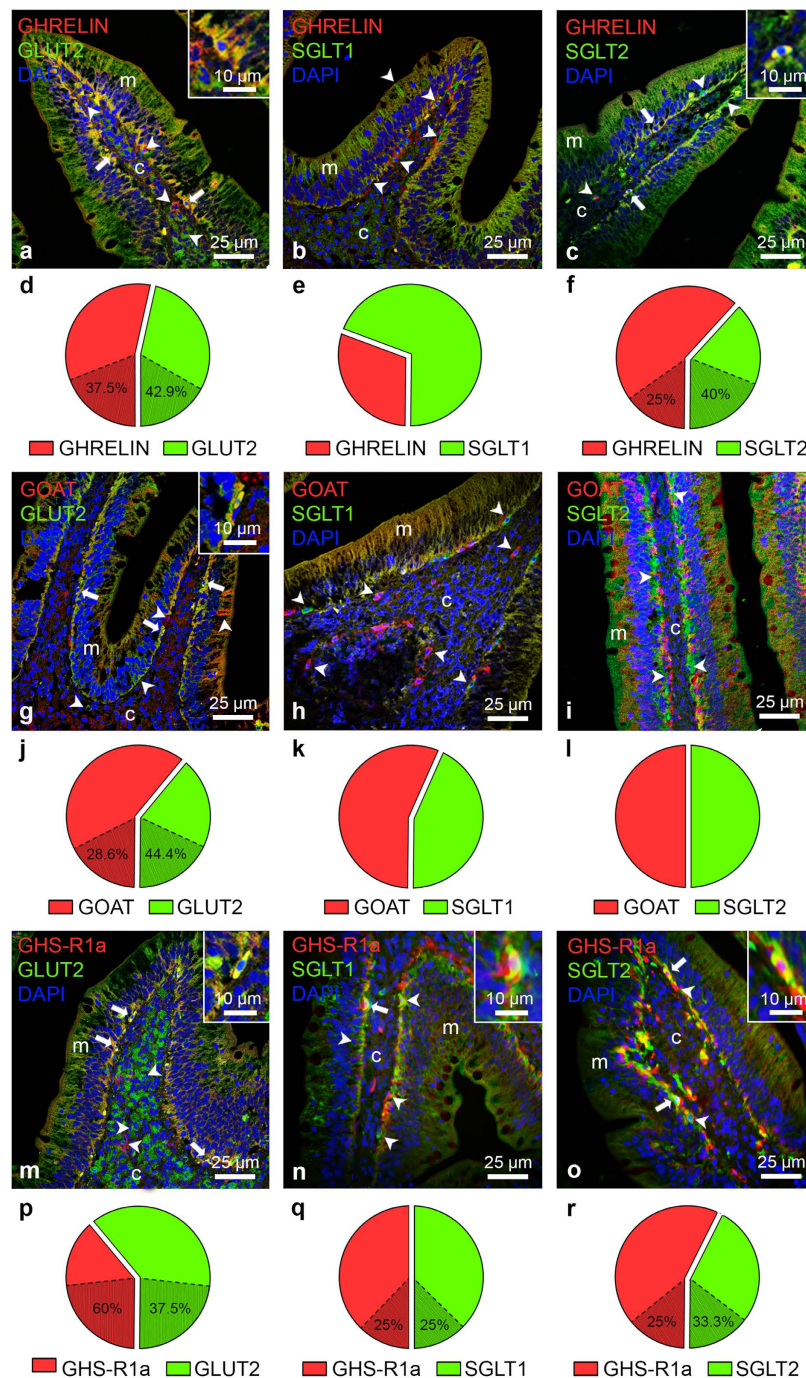


Figure 2. Ghrelin-like/GOAT-like/GHS-R1a and GLUT2-like/SGLT1-like/SGLT2-like double immunostaining in goldfish intestine assessed by immunohistochemistry. (a–c, g–i, m–o) Representative transverse sections of intestine showing merged images of ghrelin (red) and GLUT2, SGLT1 and SGLT2 (green) (a–c), GOAT (red) and GLUT2, SGLT1 and SGLT2 (green) (g–i) and GHS-R1a (red) and GLUT2, SGLT1 and SGLT2 (green) (m–o). Cells that show colocalization between the two assessed molecules are stained in yellow. All images are merged with DAPI showing nuclei in blue. Arrowheads (▶) indicate cells stained with either ghrelin/GOAT/GHS-R1a or GLUT2/SGLT1/SGLT2, and solid arrows (→) show cells that colocalize both ghrelin/GOAT/GHS-R1a and each of the glucose transporters. A magnified image of representative cells positive to both ghrelin/GOAT/GHS-R1a and GLUT2/SGLT1/SGLT2 is shown in square inset in each figure. Scale bars (μm) are indicated in each image. (c) connective tissue (lamina propria + submucosa); (m), mucosa. Images were captured using a Leica TCS SP5 confocal microscope, except for n and o which were captured using a fluorescence microscope. (d–f, j–l, p–r) Relative abundance of ghrelin/GOAT/GHS-R1a (red) and GLUT2/SGLT1/SGLT2 (green) cells in the intestine of goldfish. Data are presented as relative abundance of each of the two cell-types studied in each case, assessed by counting the total number of the different cells in three sections. The percentage of each cell-type that colocalizes with the other is shadowed and indicated in the figure.

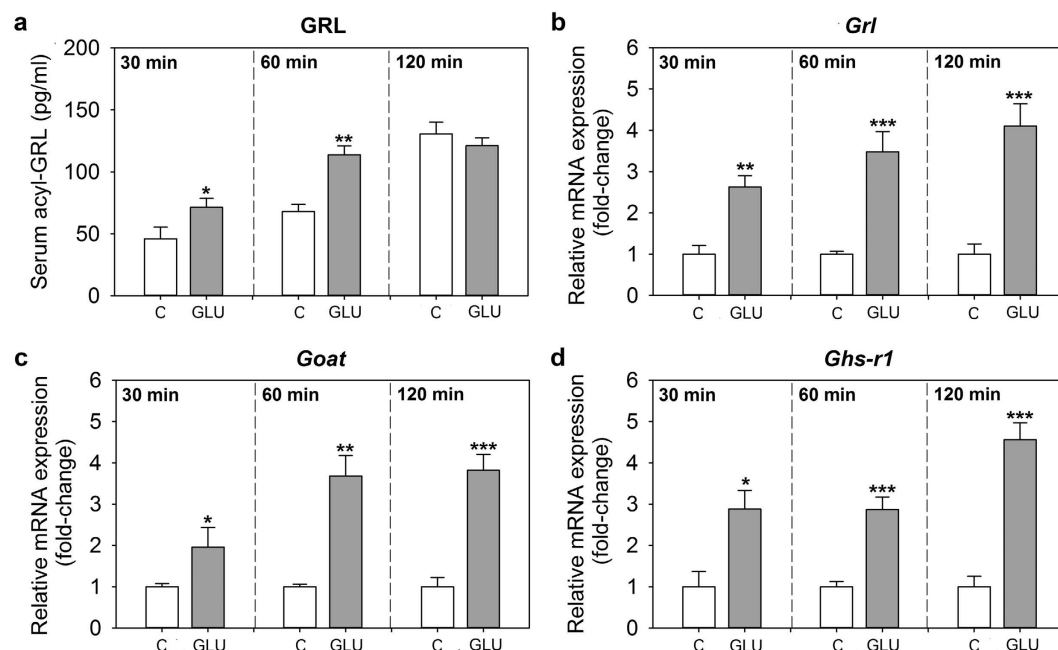


Figure 3. Effects of intraperitoneal administration of glucose (GLU) on circulating levels of acylated ghrelin (a) and on the expression of *preproghrelin* (b), *goat* (c) and *ghs-r1* (d) mRNAs in goldfish intestine. Fish were injected with saline alone or containing D-glucose (2 mg/g bw), and samples were collected at 30, 60 and 120 min post-injection. Circulating hormone levels and mRNA levels were quantified by ELISA and RT-qPCR, respectively. Data are presented as mean + SEM (n = 6 fish). Asterisks denote statistical differences between control and treated group assessed by t-test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). C, control.

intestine was also upregulated by glucose at 30, 60 and 120 min post-injection when compared to the control (Fig. 3b–d). In all cases, the highest increase in mRNA levels was observed at 120 min.

Ghrelin increases GLUT2, SGLT1 and SGLT2 in goldfish intestine *in vivo* and *in vitro*. A single ip injection of ghrelin caused a significant decrease in blood glucose levels at 120 min post-injection when compared to the control group. No differences in glycaemia were observed between saline- and ghrelin-injected fish at 30 and 60 min post-injection (Fig. 4a). Intestinal expression of *glut2* and *splt2* was 2-fold increased by ghrelin administration at 120 min, while remained unaltered at 30 and 60 min (Fig. 4b,d). Finally, ghrelin injection led to a 2-, 1.5- and 1.7-fold upregulation of *splt1* mRNA levels in the intestine at 30, 60 and 120 min, respectively (Fig. 4c).

In vitro exposure of intestinal portions to different concentrations of ghrelin resulted in a significant upregulation of *glut2* transcripts at 120 min, while a downregulation was observed at 60 min, with all ghrelin concentrations tested (0.1, 1 and 10 nM). No differences in the expression of this glucose transporter were observed after 30 min of treatment with ghrelin (Fig. 5a). Expression of *splt1* mRNA was upregulated by all ghrelin concentrations tested at 30, 60 and 120 min post-incubation. The magnitude of the increases was of around 2.5-3-fold (at 30 min), 2.2-2.5-fold (at 60 min) and 4-7-fold (at 120 min) (Fig. 5c). Finally, ghrelin caused a 4-5-fold increase in *splt2* mRNAs at 120 min, but no changes were observed at 30 and 60 min (Fig. 5e). Regarding protein levels, GLUT2 and SGLT1 were induced by *in vitro* treatment of intestinal portions with 0.1, 1 and 10 nM ghrelin (Fig. 5b,d). The higher concentrations of ghrelin (1 and 10 nM) also induced the expression of SGLT2 protein (Fig. 5f). Protein molecular weights of the transporters studied are: 57 kDa for GLUT2 and 73 kDa for SGLT1 and SGLT2.

GHS-R1a and the PLC/PKC intracellular signal transduction pathways are involved in the ghrelin-induced upregulation of glucose transporter expression. The presence alone of the GHS-R1a antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 in the intestinal *in vitro* preparations did not modify the expression of any of the glucose transporters tested at 120 min (Fig. 6a,d,g). The incubation of the preparations with the antagonist prior to the addition of ghrelin attenuated the increases in *glut2*, *splt1* and *splt2* mRNA expression induced by 1 and 10 nM ghrelin, resulting in expression values not statistically different from control groups (Fig. 6a,d,g).

The PLC inhibitor (U73122) and the PKA inhibitor (H89) by themselves did not modify the expression of glucose transporters in cultured intestine (Fig. 6b,c,e,f,h,i). Pre-incubation with U73122 completely abolished the induction of *glut2*, *splt1* and *splt2* expression by ghrelin at 120 min (Fig. 6b,e,h). Ghrelin was also unable to upregulate the expression of intestinal *splt2* in the presence of H89 in the culture media (Fig. 6i). However, the ghrelin-induced upregulation of *glut2* and *splt1* was not blocked by the pretreatment with H89 (Fig. 6c,f).

Ghrelin stimulates the translocation of GLUT2, but not SGLT1 and SGLT2, into the plasma membrane of goldfish intestinal cells. The amount of GLUT2 present at the surface of primary goldfish intestinal cells was 1.4-fold increased by 30 min of exposing the cells to culture media containing 10 nM ghrelin,

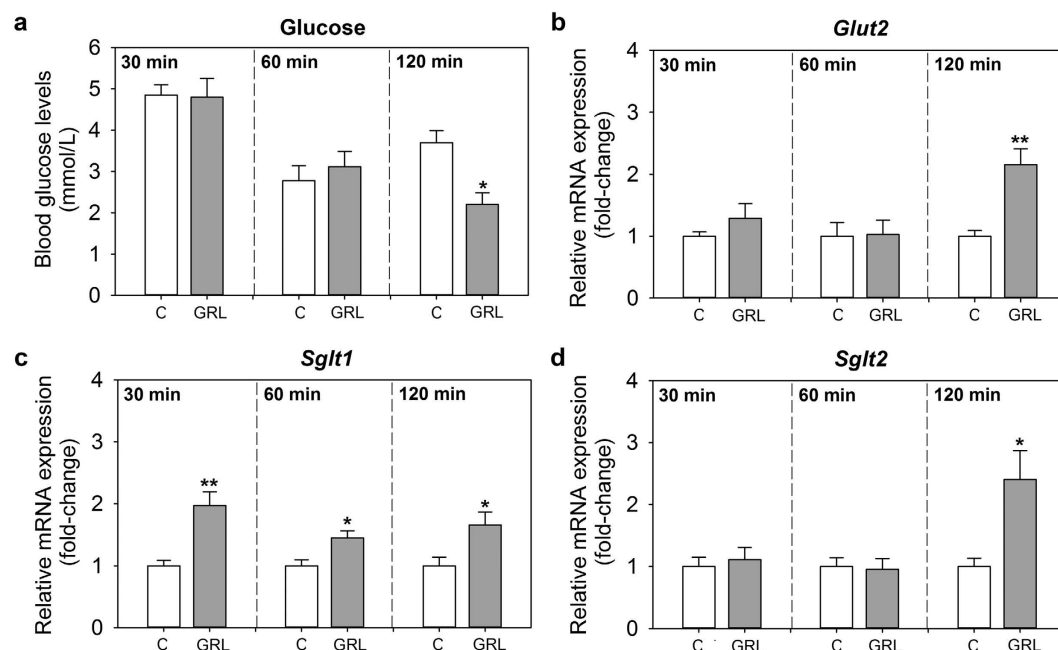


Figure 4. Effects of intraperitoneal administration of ghrelin (GRL) on blood glucose levels (a) and on the expression of *glut2* (b), *splt1* (c) and *splt2* (d) mRNAs in goldfish intestine. Fish were injected with saline alone or containing goldfish ghrelin (100 ng/g bw), and samples were collected at 30, 60 and 120 min post-injection. Gene expression levels were quantified by RT-qPCR. Data are presented as mean + SEM (n = 6 fish). Asterisks denote statistical differences between control and treated group assessed by t-test (*p < 0.05, **p < 0.01). C, control.

when compared to cells treated with media alone. No effects were observed when the exposure time was 60 or 120 min (Fig. 7a). Ghrelin did not elicit any effect in the translocation rate of SGLT1 and SGLT2 at any of the time points tested (Fig. 7b,c).

Discussion

This research characterized the cellular distribution of glucose transporters in goldfish intestine, and demonstrated for the first time its regulation by the gut-brain orexigenic hormone ghrelin. The presence of glucose transporters in the fish intestine has been previously studied using PCR techniques, having been demonstrated that the fish intestinal walls expresses the transporters GLUT2^{13,47} and SGLT1¹⁵. Furthermore, some studies using isolated enterocytes⁴⁸ and intestinal membrane vesicles preparations¹⁰ have determined the transport rate and so the affinity of these two transporters in fish. The results of the present study showing the presence of these two transporters in the goldfish intestine are in accordance with previous observations, and additionally report the presence of SGLT2 in the intestine. Besides, we offer additional information on their cellular distribution. Specifically, we observed the presence of GLUT2 in the basolateral border and of SGLT1 in the brush border of the mucosal cells, consistent with the putative location previously suggested for these two transporters within the fish enterocyte⁴⁸, and in agreement with the classical model of intestinal glucose absorption in mammals: SGLT1 mediates glucose absorption from the intestinal lumen, whereas GLUT2 provides basolateral exit^{3,49}. According to kinetics studies^{10,48}, GLUT2 and SGLT1 in fish would function similar to mammals, transporting glucose with low and high affinity, respectively. However, not only GLUT2 but also SGLT1 and SGLT2 were detected in the basolateral border of the goldfish mucosal cells, suggesting that the three transporters might participate in the transport of glucose from cytosol to the blood in the goldfish.

Double immunostaining of goldfish intestinal sections showed that GLUT2 and SGLT2 are present in mucosal cells expressing ghrelin. Some GLUT2-positive cells were also observed to contain GOAT, the enzyme responsible for its acylation. Although glucose transporters are mainly present in enterocytes, the presence of some of them, especially SGLT1, has been reported in enteroendocrine cells of both mammals^{50,51} and fish^{14,15}. It has been suggested that this transporter, together with taste receptors and other G protein-coupled receptor, are present in some enteroendocrine cells as part of the machinery that interacts with chemical food components to trigger the release of gut peptides, such as cholecystokinin, peptide YY, GIP and GLP-1^{50,51}. Furthermore, Gorboulev and coworkers⁵² reported that the secretion of GIP and GLP-1 is stimulated by fat ingestion in both wild-type and SGLT1-deficient mice, but not by glucose in SGLT1-deficient mice, clearly showing that SGLT1 plays a critical role in incretins secretion in response to glucose *in vivo*. Results from the present study show that glucose plays an important stimulatory role in the secretion of ghrelin, as well as in the intestinal mRNA expression of *preproghrelin*, *goat* and *ghs-r1*, in accordance with previous observation in tilapia⁵³. The fact that the glucose modulation of the ghrelinergic system was observed at all the time points tested indicates a high sensitivity of the ghrelinergic system to glucose and points to a rapid and maintained action of this monosaccharide on the system.

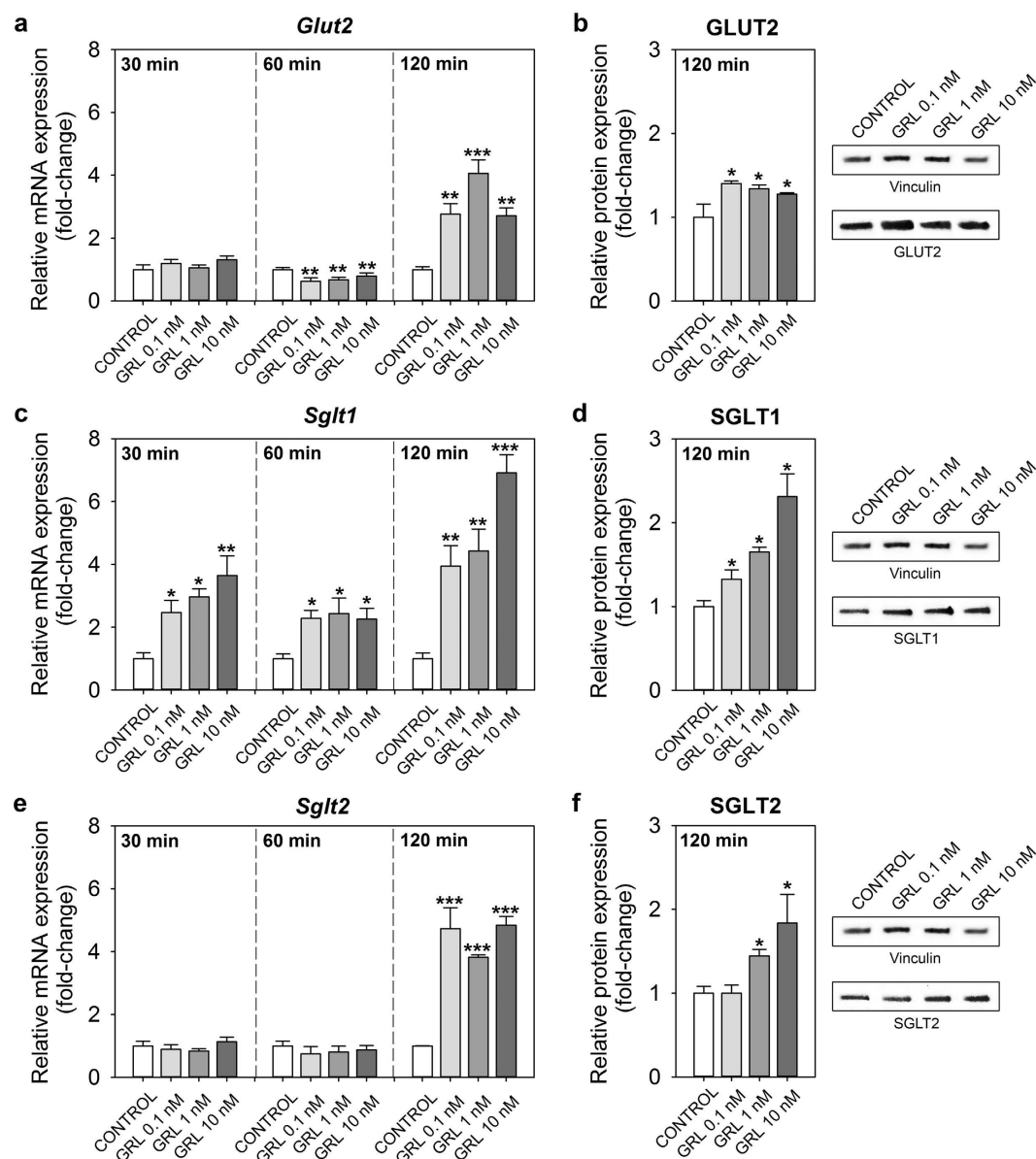


Figure 5. Effects of *in vitro* treatment with ghrelin (GRL) on the mRNA expression (left panel) and protein levels (right panel) of GLUT2, SGLT1 and SGLT2 in goldfish cultured intestine. (a,c,e) Concentration and time-dependent effects of ghrelin on glucose transporters gene expression. Cultured intestine was incubated with DMEM alone (control) or containing different concentrations of ghrelin (0.1, 1 and 10 nM) during 30, 60 and 120 min. Data obtained by RT-qPCR is shown as mean + SEM (n = 6 fish). Asterisks denote statistical differences between control and treated groups assessed by ANOVA and Student-Newman-Keuls post-hoc test (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). (b,d,f) Protein levels of glucose transporters in cultured intestine treated with different concentrations of ghrelin (0.1, 1 and 10 nM) during 120 min. Data are presented as band density of GLUT2/vinculin, SGLT1/vinculin and SGLT2/vinculin (n = 3 fish). Representative blots from one fish are shown in image. Gel images shown here were cropped to show specific bands of expected size representing glucose transporters. Asterisks denote statistical differences between control and treated groups assessed by ANOVA and Student-Newman-Keuls post-hoc test (*p < 0.05).

The observed stimulatory effect of glucose on ghrelin might be governed by first an intestinal sensing of the monosaccharide, mechanism in which glucose transporters are known to play a role⁵⁴. In the present study, the fact that GLUT2 and SGLT2, but not SGLT1, are coexpressed with ghrelin in the same cells suggests a role for GLUT2 and/or SGLT2, but not SGLT1, in ghrelin release from fish goldfish gut endocrine cells.

Using double immunofluorescence, we also observed that a considerable percentage (37.5%, 25% and 33.3%, respectively) of GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-positive intestinal cells coexpress the ghrelin receptor GHS-R1a, suggesting that they are susceptible to modulation by ghrelin. To the best of our knowledge, no studies have previously reported a role for ghrelin in the modulation of glucose transporters in the intestine of any vertebrate. A role for ghrelin in this function has been shown, however, in other tissues, such as the hypothalamic astrocytes³⁰,

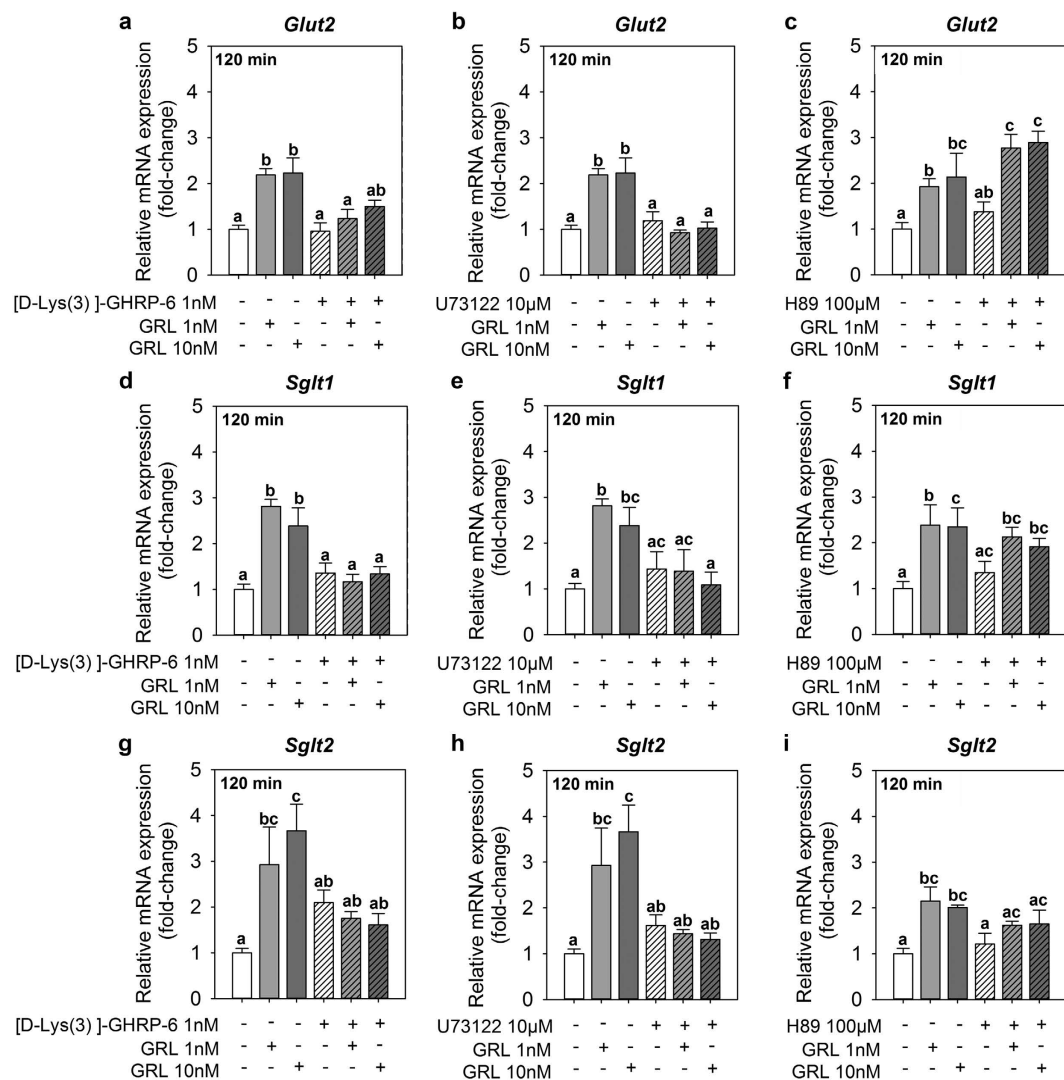


Figure 6. Relative expression of *glut2* (a–c), *sgl1* (d–f) and *sgl2* (g–i) mRNAs in goldfish cultured intestine treated with ghrelin (GRL) and either the GHS-R1a antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 (left panel), the PLC inhibitor U73122 (middle panel) or the PKA inhibitor H89 (right panel) at 120 min post-incubation. The antagonist (1 nM) and inhibitors (10 μM for U73122 and 100 μM for H89) were added to the culture plates 15 min prior to the addition of ghrelin (1 and 10 nM). Data obtained by RT-qPCR are shown as mean ± SEM (n = 6 fish). Different letters indicate statistical differences among groups assessed by ANOVA and Student-Newman-Keuls post-hoc test (p < 0.05).

the white adipocytes³¹, and the cardiomyocytes³² of mammals, and the hypothalamus and hindbrain of fish³⁴. Using both *in vivo* and *in vitro* approaches, here we demonstrated an important stimulatory role for ghrelin in the gene expression of the three transporters in the intestine of goldfish. Protein levels of the transporters were also upregulated by ghrelin *in vitro*. While protein was not quantified in the *in vivo* study, it is highly likely that the increases in mRNA expression observed *in vivo* (as well as in the rest of the experiments) correspond with an increase in protein. Almost all the changes at the mRNA level observed *in vitro* extended to proteins. The fact that ghrelin modulates glucose transporters suggests an important role for this hormone on intestinal glucose transport. A hormonal regulation of this process in fish has been suggested previously in a study showing that glucagon, GLP-1, glucocorticoids (dexamethasone) and catecholamines (isoproterenol) significantly increase the rate of brush-border glucose transport in the enterocytes of the black bullhead⁴⁸. Further studies would be needed to investigate the physiological significance of both anabolic (ghrelin) and catabolic (the others) hormones stimulating glucose absorption. Among the three transporters tested in the present study, SGLT1 seems to be the more sensitive to ghrelin, as its expression was upregulated during all the time points studied. Expression of GLUT2 and SGLT2, however, was only affected at 120 min post-injection/post-incubation. This indicates a chronology in the actions of ghrelin on the different glucose transporters, which might be in accordance with first facilitating the absorption of glucose from the intestinal lumen (which is mainly mediated by SGLT1) and then assisting in its transport to the blood.

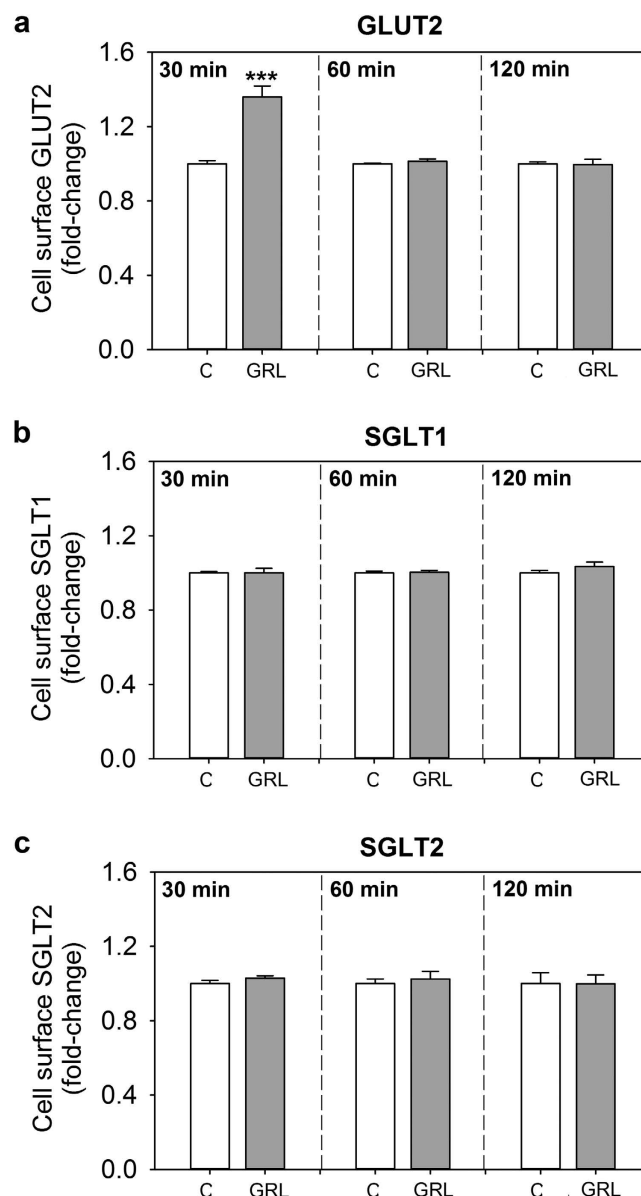


Figure 7. Levels of GLUT2 (a), SGLT1 (b) and SGLT2 (c) in the surface of goldfish intestinal cells treated with ghrelin (GRL) during 30, 60 and 120 min. The fraction of each glucose transporter at the cell surface was calculated as the ratio of surface to total cellular glucose transporter. Data are expressed as mean + SEM (n = 6 wells). Asterisks denote statistical differences between control and treated group assessed by t-test (***) $p < 0.001$. C, control.

While ghrelin seems to enhance intestinal glucose absorption, *in vivo* ghrelin treatment resulted in a decrease in blood glucose levels. This is likely due to similar stimulatory effects of ghrelin on glucose transporters in other locations in order to facilitate glucose absorption into them, so determining an eventual decrease in circulating glucose. One of such locations seems likely to be the liver, as supported by the fact that the expression of *glut2* and *splt1* are also upregulated by ghrelin in this tissue (Supplementary Fig. S5). The fact that the stimulatory effects of ghrelin on glucose transporters in both the intestine and liver are observed within the same time window suggests that this hormone is simultaneously promoting glucose absorption from the intestinal lumen to the circulation and glucose uptake from the blood to storage locations, thereby preventing a condition of hyperglycemia. The effects of ghrelin on glycemia seem, however, controversial within the literature, as previous studies have shown that administration of this hormone does not alter circulating glucose levels in rainbow trout³⁴ while produces a significant increase in tilapia⁵⁵. These species-specific discrepancies might be dependent on different dietary habits, although more studies would be needed to elucidate the species- and tissue-specific effects of ghrelin on metabolic partitioning, and glucose production in fishes.

Results presented here demonstrate that all of the observed effects of ghrelin on gene expression are mediated by its receptor GHS-R1a, as all the inductions in expression were abolished by the use of the receptor antagonist

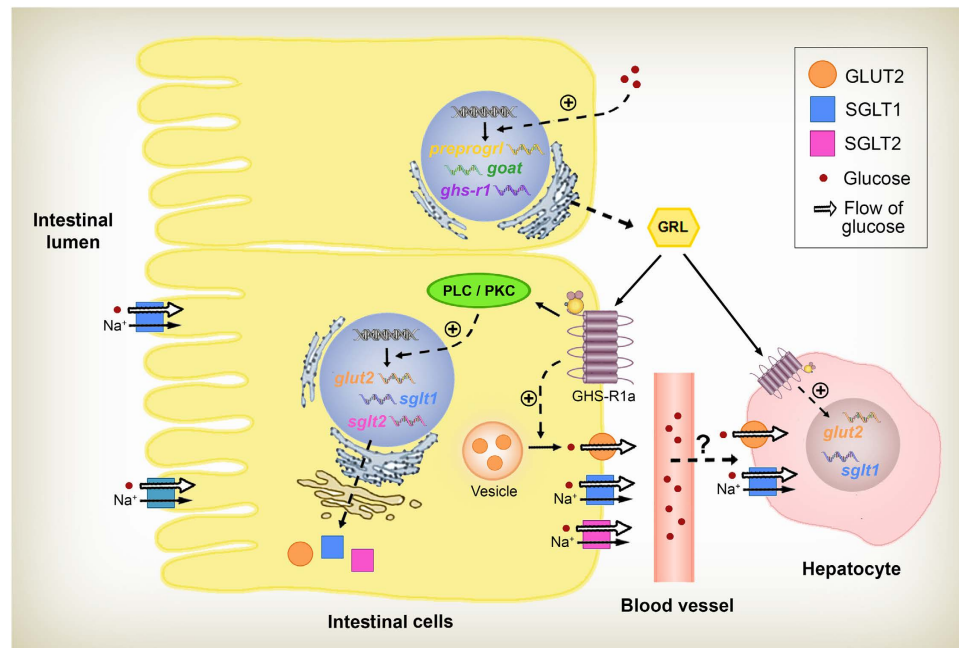


Figure 8. Schematic representation of the proposed ghrelinergic regulation of glucose transport machinery in the intestinal cells of goldfish. Mucosal cells of the goldfish intestine contain the glucose transporters SGLT1 in the apical or brush border, and GLUT2, SGLT1 and SGLT2 in the basolateral border. Ghrelin, via the GHS-R1a and the PLC/PKC pathway, would modulate the gene transcription in the nucleus, enhancing the expression of *glut2*, *sglt1* and *sglt2*. This increase in the number of transcripts would also be reflected in the amount of each of the proteins. Additionally, ghrelin would stimulate the translocation of GLUT2 from intracellular vesicles to the surface of intestinal cells, all of this to facilitate the absorption of glucose. All this ghrelinergic action might be initiated by a glucose-induced upregulation of the intestinal ghrelinergic system. We furthermore hypothesize that ghrelin would facilitate glucose uptake into hepatocytes via GLUT2 and/or SGLT1 transporters. GHS-R1a, growth hormone secretagogue receptor 1a; GRL, ghrelin; PKC, phosphokinase C; PLC, phospholipase C.

[D-Lys3]-GHRP-6. Which intracellular signaling pathway(s) does this receptor trigger to exert ghrelin actions on glucose transporters? Literature shows that the GHS-R1a is classically linked to a signal transduction mechanism involving an increase in the cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), especially via the PLC/PKC and the AC/PKA pathways^{39–41,56}. These two signal transduction mechanisms have been reported to mediate various actions of ghrelin/GHS-R1a. For instance, in mammals, the PLC/PKC pathway has been involved in the release of growth hormone (GH) from pituitary⁵⁷, whereas the AC/PKA pathway has been reported to mediate the interaction between ghrelin and neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus⁵⁶. In fish, both the PLC/PKC and the AC/PKA pathways were involved in the ghrelin-induced GH and gonadotrophin release from goldfish pituitary cells⁴¹ and the actions of ghrelin on clock gene expression in goldfish (Sánchez-Bretaña *et al.*, *under review*). In this study, all ghrelin-evoked gene expression inductions are blocked by the use of a PLC inhibitor (U73122), but not by the PKA inhibitor (H89). These results provide reliable evidence indicating that the PLC/PKC pathway, but likely not the AC/PKA pathway, is the responsible for the intracellular signal transduction that will eventually modulate the expression of glucose transporters after ghrelin binds to GHS-R1a. While we are providing evidence that the AC/PKA pathway does not mediate such ghrelin effects, present results do not exclude the possible involvement of other signaling pathways. Indeed, GHS-R1a has been reported to trigger the AMPK, MAPK or mTOR intracellular cascades to mediate some ghrelin actions³⁹.

To deepen the knowledge of the mechanisms underlying ghrelin actions on intestinal glucose transporters, our last objective was to determine whether ghrelin modulates transporter translocation into the cell surface. Immunoblotting analysis in goldfish primary intestinal cells revealed that ghrelin increases the amount of GLUT2, but not SGLT1 and SGLT2, at the plasma membrane. This effect was only observed at 30 min post-incubation with ghrelin, but not after longer exposure times, indicating that this modulatory action of ghrelin on glucose transporter translocation is time-specific. The translocation of GLUT2 from intracellular vesicles into the plasma membrane has been previously reported in *in vivo* perfusion studies in rats as a mechanism to allow bulk absorption of glucose by facilitated diffusion after high luminal glucose loads^{3,5}. This rapid insertion of GLUT2 into the plasma membrane has been shown to be modulated by some hormones, such as glucagon-like peptide 2 (GLP-2), which was reported to promote the translocation of this transporter into the rat jejunal brush-border membrane⁵⁸. Findings from the present study represent the first demonstration that ghrelin is able to cause the translocation of GLUT2 in intestinal cells, likely resulting in an improved ability of these cells to take up glucose.

In summary, our data indicates that an important crosstalk between ghrelin and cellular glucose transport occurs in the intestine of goldfish. A proposed model for this crosstalk is summarized in Fig. 8. First, an increased

expression of all components of the ghrelinergic system in the intestine and ghrelin secretion after glucose treatment indicates that this monosaccharide stimulates ghrelin. It is plausible that ghrelin would respond to an increase in glucose by upregulating the expression of its transporters GLUT2, SGLT1 and SGLT2, as well as by promoting the translocation of GLUT2 into the plasma membrane of intestinal cells, all these for facilitating the absorption of glucose. The involvement of two parameters related to glucosensing in fish (GLUT2 and SGLT1;⁵⁴) in this sequence of actions could point to a glucosensing response of intestinal cells modulated by ghrelin: intestinal cells would detect changes in glycaemia and respond to them by producing higher levels of ghrelin, which would in turn modulate glucosensing via an action on glucose transporters. Apart from affecting intestinal glucose transport, ghrelin would also facilitate the uptake of glucose from the blood to the hepatic cells, likely helping to avoid a situation of hyperglycemia and to store glucose. This ghrelinergic regulation of glucose transport would operate during feeding in order to improve nutrient utilization, thus being initiated by the high levels of ghrelin known to be in circulation before a meal⁵⁹. Additionally, it has been reported that the ghrelin-induced activation of the glucosensor system in the brain of rainbow trout would eventually lead to an effect on food intake³⁴. It is thereby possible that this ghrelinergic regulation of intestinal glucose transport relate to the effects of ghrelin on food intake in fish. On a larger scale, we can also hypothesise that this regulatory mechanism would help fish to cope with the varied food availability situations they have to face in their natural environments. Overall, these novel results demonstrate that ghrelin plays an important role in glucose transport across the goldfish intestinal walls, thus participating in glucose homeostasis in fish. Further investigations would be needed to test the effects of ghrelin on the transporter activity and to determine whether this peptide is also a modulator of glucose transport in other key organs.

Methods

Animals. Goldfish (*Carassius auratus*), with a body weight (bw) of 5 ± 1 g (for immunohistochemistry) or 32 ± 8 g (for *in vivo* and *in vitro* studies), were obtained from a commercial supplier (Aquatic Imports, Calgary, AB, Canada). Fish were housed in either 300 L aquaria with filtered fresh water at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ and continuous aeration (for immunohistochemistry and *in vitro* studies), or 10 L aquaria ($n = 3/\text{aquarium}$) with a constant flow of temperature-controlled water ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) (for *in vivo* studies). Fish were maintained under a 12 h light:12 h darkness (12 L:12 D) photoperiod (lights on at 07:00 h), and fed daily at 10:00 h with food from a commercial pellet diet for goldfish (1% bw; Goldfish granules, Aqueon, Franklin, WI, USA). All fish studies adhered to the Canadian Council of Animal Care guidelines, and research protocols were approved by the Animal Research Ethics Board of the University of Saskatchewan (Protocol Number 2012-0082).

Reagents. D-glucose was obtained from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada) and prepared in saline (Catalog # JB1323, Baxter, Mississauga, Canada) at a concentration of $2 \text{ mg}/10 \mu\text{l}$ saline. The acylated 19 amino acid isoform of goldfish ghrelin (GTS(Octanoyl)FLSPAQKPQGRPPRM) was custom synthesized by GenScript (Piscataway, NJ, USA). For *in vivo* studies, peptide was reconstituted in distilled water and then prepared in saline at a concentration of $100 \text{ ng}/10 \mu\text{l}$ saline. For *in vitro* studies, ghrelin was reconstituted in distilled water at a stock concentration of $100 \mu\text{M}$. The GHS-R1a ghrelin receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 and the PLC inhibitor U73122 (both from Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) stock solutions were dissolved in absolute ethanol at a concentration of 10 mM . Stock solution of the PKA inhibitor H89 (Sigma-Aldrich) was prepared in distilled water at a concentration of 10 mM . All the stock solutions (ghrelin, [D-Lys3]-GHRP-6, U73122 and H89) were diluted in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 44 mM sodium bicarbonate, 1% penicillin-streptomycin and 0.05% gentamicin (DMEM+) to reach the required experimental concentrations just before use. The DMEM+ used for control and ghrelin-treated groups in the experiments using [D-Lys3]-GHRP-6 and U73122 (reconstituted in an ethanol) was supplemented with the same amount of ethanol (0.05%) to minimize possible deviations.

Immunohistochemistry. Samples from anterior intestine (1–2 cm after the intestinal bulb) were collected as previously described⁶⁰ and processed (dehydrated and embedded in paraffin) at the Prairie Diagnostic Services, University of Saskatchewan. Paraffin blocks were then sectioned at $7 \mu\text{m}$ thickness, and transversal sections were mounted onto Superfrost slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The protocol for IHC was performed as previously described⁶¹ with slight modifications. Briefly, after deparaffination, rehydration, washing and blocking, sections were incubated overnight with the corresponding primary antibody/es ($1:200$ dilution) at room temperature. In general, a mixture of two antibodies was prepared for colocalization studies, except for the antibodies used for GOAT, GHS-R1a, SGLT1 and SGLT2 which are all raised in the same host species. In these cases, colocalization was approached by staining consecutive sections with the different antibodies separately. Primary antibodies used were: mouse monoclonal to ghrelin, Catalog # ab57222; rabbit polyclonal to GOAT, Catalog # ab140889; rabbit polyclonal to GHS-R1a, Catalog # ab95250; goat polyclonal to GLUT2, Catalog # ab111117; rabbit polyclonal to SGLT1; Catalog # ab14686; rabbit polyclonal to SGLT2; Catalog # ab85626 (all from Abcam, Toronto, ON, Canada). Since heterologous antibodies were used here, it is likely that a certain degree of non-specificity exists in our findings. Therefore, the suffix “-like” was used to refer to immunostaining obtained. The following day, sections were washed and subsequently incubated for 1 h at room temperature with a mixture of one (single stainings) or two (double staining) secondary antibodies ($1:2000$ dilution each). Secondary antibodies used were: donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488, goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 594 (all from Invitrogen, Burlington, Canada), goat anti-mouse Alexa Fluor 647, donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647 (both from Abcam), and Texas Red anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlington, Canada). A separate set of negative control slides were only treated with the secondary antibodies. All primary and secondary antibodies were diluted in antibody diluent reagent (Dako, Mississauga, ON, Canada). Finally, slides were mounted using VECTASHIELD Mounting Medium containing

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlington, ON, Canada) and assessed using either a Nikon Eclipse Ti-Inverted fluorescence microscope (Nikon Instruments, Melville, USA) or a Leica TCS SP5 confocal microscope (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada). Micrographs were adjusted linearly for light and contrast using Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA).

For the quantification of immunopositive cells, the number of cells in the mucosa and submucosa immunoreactive for ghrelin, GOAT or GHS-R1a (red), GLUT2, SGLT1 or SGLT2 (green), or colocalizing both ghrelin/GOAT/GHS-R1a and GLUT2/SGLT1/SGLT2 (yellow) were counted in all sections assessed ($n = 3$ sections). The abundance of the different glucose transporters in the goldfish intestine was determined by calculating the percentage of the number of positive cells for each of the transporters in relation to the total number of immunoreactive cells to any of the transporters (GLUT2 + SGLT1 + SGLT2). In the colocalization studies, the total number of cells counted for ghrelin, GOAT or GHS-R1a alone and for GLUT2, SGLT1 or SGLT2 alone was plotted in pie-charts, showing the relative abundance of ghrelin/GOAT/GHS-R1a and GLUT2/SGLT1/SGLT2 in each of the assessed combinations. Then, to calculate the percentage of ghrelin/GOAT/GHS-R1a cells that colocalizes GLUT2/SGLT1/SGLT2 and *vice versa*, the number of cells positive for the two peptides was calculated as a percentage of the total number of ghrelin/GOAT/GHS-R1a cells (for the first case) or of the total number of GLUT2/SGLT1/SGLT2 (for the second case). These percentages were indicated and shadowed in the corresponding pie-charts.

In vivo studies. *Effects of glucose administration on the ghrelinergic system.* Goldfish ($n = 6$ fish/group) were anesthetized in 0.5% tricaine methanesulfonate (TMS; Syndel Laboratories, Vancouver, BC, Canada) and ip injected with saline alone (control) or containing D-glucose (2 mg/g bw). Glucose dose was chosen based on previous studies⁶². Injections were carried out at 10:00, in 24-h fasted fish, and were performed close to the ventral midline posterior to the pelvic fins. At 30, 60 and 120 min post-injection, fish were anesthetized and samples of blood were collected from the caudal vein for quantifying ghrelin levels in serum. Fish were sacrificed by spinal dissection and samples of anterior intestine (approximately 1 cm after the intestinal bulb) were collected, quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until quantification of mRNA levels (see *Real-time quantitative PCR* section).

Effects of ghrelin administration on intestinal glucose transporters. Goldfish ($n = 6$ fish/group) were anesthetized in 0.5% TMS and ip injected with saline alone (control) or containing goldfish ghrelin (100 ng/g bw, $3\mu\text{M}$). Injections were performed as described for the previous experiment. At 30, 60 and 120 min, fish were anesthetized and a spinal transection was carried out, followed by monitoring of blood glucose levels using a glucometer (One-Touch Ultra2; Johnson and Johnson Co., Burnaby, BC, Canada)⁶³. Samples of anterior intestine were collected for gene expression analysis (see *Real-time quantitative PCR* section).

In vitro organotypic studies. *Concentration- and time-response effects of ghrelin on glucose transporter expression.* Tissue culture was performed as previously described for goldfish⁶⁴ with slight modifications. Briefly, intestinal portions (1–2 mm width; approximately 20 mg/portion) from the anterior intestine (from the end of the intestinal bulb until the J-loop) of 24-h-fasted goldfish ($n = 6$) were immersed in DMEM supplemented 10% penicillin-streptomycin and 0.5% gentamicin for 1 min, and then distributed in different wells of sterile culture 24-well multidish plates. Plates were preincubated for 2 h in 1 mL of DMEM+ at 23°C under an atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 for stabilization. Then, medium was replaced by 1 mL of fresh DMEM+ alone (6 wells, each well loaded with tissues from a different fish) or DMEM+ containing ghrelin (0.1, 1 or 10 nM; 6 wells each), and plates were incubated for 30, 60 or 120 min. At the end of each culture time, intestine samples were collected and stored at -80°C until total RNA or protein was extracted (See *Real-time quantitative PCR* and *Western Blot* sections).

Involvement of the GHS-R1a ghrelin receptor and the PLC-PKC and AC-PKA pathways on ghrelin action. Intestine portions from 6 fish were prepared in 24-well multidish plates as described above. After the 2 h stabilization period, medium was replaced by 500 μL of fresh DMEM+ containing either the respective vehicle, the ghrelin receptor antagonist ([D-Lys3]-GHRP-6; 2 nM) or one of the inhibitors (U73122; 20 μM , or H89; 200 μM). After 15 min, 500 μL of DMEM+ containing the respective vehicle or ghrelin (2 or 20 nM) were added to the corresponding wells. Final concentrations of drugs in each well were: 1 nM for [D-Lys3]-GHRP-6, 10 μM for U73122, 100 μM for H89 and 1 nM and 10 nM for ghrelin. Plates were incubated for 120 min, before samples were collected for gene expression determination.

In vitro studies using primary intestinal cells. *Isolation of intestinal cells from goldfish.* Protocol for isolating intestinal cells was adapted from the protocol described by El-Sabry and colleagues⁶⁵ in rainbow trout. The intestine from goldfish ($n = 5$) was removed, freed from mesenteric fat, and rinsed three times in autoclaved deionised water. Tissue was incubated twice in DMEM containing 44 mM sodium bicarbonate, 2% penicillin-streptomycin and 0.1% gentamicin for 1 h at 4°C . The intestine was then longitudinally opened, cut into 1 cm^2 pieces and incubated in collagenase (Sigma-Aldrich) in DMEM+ (1 mg/mL) for 24 h at 4°C . The following day, after the intestine pieces were shaken and the enterocytes were detached from the mucosa using a Pasteur pipette, the resulting intestinal cell suspension was filtered through a 30 μm mesh, collected in tubes and centrifuged (5 min at 3000 g). The pellet containing the intestinal cells was washed three times in DMEM+ and then resuspended in DMEM. Intestinal cells were plated onto gelatin coated 24-well plates at a concentration of 1×10^6 cells/mL. Cells were grown in DMEM+ supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) at 23°C under an atmosphere of 5% CO_2 and 95% O_2 . The culture medium was changed every day to remove non-adherent cells. Viable intestinal cells were round and characterized by smooth non-folded cell membrane, and they typically achieved confluency on the third day.

Gene	GenBank accession number	Primer sequence (5' to 3')	Product size (bp)
<i>preproghrelin</i>	AF454389.1	F: ATTCAGAGTGTGTGTCGTA R: AGGAAAGAGCACATAAGA	103
<i>goat</i>	KT726983	F: ATTGCTGTTCTTCAGTGCCG R: TGTACAAAGTCCAGACGGTT	119
<i>ghs-r1</i>	AB504275.1/AB504276.1	F: ATTCGAGCACCCGGTCAACA R: TCCAGGGGCATGCAGAGAAA	207
<i>glut2</i>	DQ098687.1	F: TGTGCTGTGGCCATGAC R: CCAGGTCCGATCTCAAAGAA	113
<i>splt1</i>	JN867793.1	F: GATCGTGACCATGCCAGAG R: TTTAGTCCCAGAGCCTGGTT	156
<i>splt2</i>	BC067629.1	F: GCACCTTGTTCACCATGGACAT R: ACCACTCTGGGCTGCCTG	146
β -actin	AB039726.2	F: CAGGGAGTGATGGTTGGCA R: AACACGCAGCTCGTTGTAGA	168

Table 1. Primers used in this study for quantifying gene expression by RT-qPCR. F, Forward primer; R, Reverse primer.

Glucose transporter translocation assay. Translocation assay was performed in confluent cells as described by Díaz and colleagues⁶⁶. Intestinal cells were serum deprived for 3–5 h and subsequently incubated with DMEM+ alone (control) or containing goldfish ghrelin (10 nM) for 30, 60 and 120 min. Medium was then removed by washing with ice-cold PBS supplemented with 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂. Briefly, to label the amount of GLUT2, SGLT1 and SGLT2 in the cell surface, cells were blocked, and incubated with primary antibody against each of the glucose transporter (1:500 dilution; see *Immunohistochemistry* section for information on antibodies used). Cells were then washed and the fixative was immediately neutralized with glycine. To label the total cellular amount of each of the glucose transporters, a separate set of intestinal cells were first fixed, quenched in glycine, and then permeabilized. After blocking, cells were incubated with GLUT2/SGLT1/SGLT2 antibody solution (1:500 dilution), and washed. Both cell surface and total cellular GLUT2/SGLT1/SGLT2-bound antibodies were probed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad) for 1 h at 4 °C, followed by detection of bound secondary antibodies using *o*-phenylenediamide (OPD; Sigma-Aldrich) and absorbance reading at 450 nm. Translocation was quantified as described by Wang and coworkers⁶⁷ using standard curves generated with each of the HRP-conjugated secondary antibodies. The fraction of GLUT2/SGLT1/SGLT2 at the cell surface was expressed as the ratio of surface to total cellular glucose transporter.

Quantification of serum acylated ghrelin. Serum levels of acylated ghrelin were measured using a fish ELISA kit (Catalog # MBS034979, Mybiosource, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer. The sensitivity of assay was 5.0 pg/mL, and the detection range was 31.2–1000 pg/mL. The amount of target peptide was determined by using a cubic regression curve-fit.

Real-time quantitative PCR. Isolation of total RNA, synthesis of cDNA and real-time quantitative PCRs were performed as described in Ramesh *et al.*⁶⁸. The specific primer sequences used for target genes, and reference gene (β -actin) are shown in Table 1 and were ordered from IDT (Toronto, ON, Canada). Primers used for quantifying ghrelin receptor were designed in a region conserved between the *ghs-r1a1* and *ghs-r1a2* sequences⁶⁹, so PCR products correspond to the sum of all *ghs-r1* mRNA isoforms. RT-qPCR cycling conditions consisted of an initial step of 95 °C for 3 min, and 35 cycles of 95 °C for 10 sec and 60 °C (for β -actin, *goat* and *ghs-r1*), 58 °C (for *glut2*, *splt1* and *splt2*) or 56 °C (for *preproghrelin*) for 30 sec. All runs were performed using a CFX Connect Real-Time System (Bio-Rad). The 2- $\Delta\Delta$ Ct method⁷⁰ was used to determine the relative mRNA expression.

Western Blot. For Western blot analysis we chose the concentrations and time in which ghrelin exerts the most significant inductions in mRNA expression. Protein extraction and quantification, and Western blot protocol were performed as previously described⁶⁸. Briefly, the samples (containing 30 μ g protein) were boiled, electrophoresed and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After blocking, target proteins within the membrane were detected by overnight incubation in 1x RapidBlock™ solution containing specific primary antibody (see *Immunohistochemistry* section for information on antibodies used). Vinculin protein was used for normalization and was detected using rabbit antiserum directed against mouse vinculin (1:2000 dilution; Catalog # ab129002, Abcam). As secondary antibodies, goat anti-rabbit or rabbit anti-goat IgG (H + L) HRP conjugate (Bio-Rad) diluted 1:3000 were used. Protein were visualized using Clarity™ Western ECL substrate (Bio-Rad) in a ChemiDoc™ MP imaging system (Bio-Rad) with chemiluminescence detection. Blot images were plotted using ImageJ software and band density of vinculin was used to normalize glucose transporters protein density.

Statistics. Statistical differences between groups were assessed using either t-test (for comparisons between two groups) or one-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test (for comparisons among multiple groups), after data were checked for normality and homogeneity of variance. Data that failed one of these requirements were log-transformed and re-checked. Significance was assigned when $p < 0.05$. All analyses were carried out using SigmaPlot version 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) statistics package.

References

- Giugliano, D., Ceriello, A. & Esposito, K. Glucose metabolism and hyperglycemia. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 217S–222S (2008).
- Wood, I. S. & Trayhurn, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* **89**, 3 (2003).
- Röder, P. V. *et al.* The role of SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS ONE* **9**, e89977 (2014).
- Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem. FEBS* **219**, 713–725 (1994).
- Chaudhry, R. M., Scow, J. S., Madhavan, S., Duenes, J. A. & Sarr, M. G. Acute enterocyte adaptation to luminal glucose: a posttranslational mechanism for rapid apical recruitment of the transporter GLUT2. *J. Gastrointest. Surg. Off. J. Soc. Surg. Aliment. Tract* **16**, 312–319 (2012).
- Scow, J. S., Tavakkolizadeh, A., Zheng, Y. & Sarr, M. G. Acute ‘adaptation’ by the small intestinal enterocyte: A posttranscriptional mechanism involving apical translocation of nutrient transporters. *Surgery* **149**, 601–605 (2011).
- Lee, W.-S. Molecular Characteristics of Na(+)-coupled glucose transporters in adult and embryonic rat kidney. *J. Biol. Chem.* **270**, 29365–29371 (1995).
- Maffia, M., Acierio, R., Cillo, E. & Storelli, C. Na(+)-D-glucose cotransport by intestinal BBMVs of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Am. J. Physiol.* **271**, R1576–R1583 (1996).
- Polakof, S., Panerat, S., Soengas, J. L. & Moon, T. W. Glucose metabolism in fish: a review. *J. Comp. Physiol. [B]* **182**, 1015–1045 (2012).
- Sala-Rabanal, M., Gallardo, M. A., Sánchez, J. & Planas, J. M. Na-dependent D-glucose transport by intestinal brush border membrane vesicles from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Membr. Biol.* **201**, 85–96 (2004).
- Ahearn, G. A., Behnke, R. D., Zonno, V. & Storelli, C. Kinetic heterogeneity of Na-D-glucose cotransport in teleost gastrointestinal tract. *Am. J. Physiol.* **263**, R1018–R1023 (1992).
- Reshkin, S. J. & Ahearn, G. A. Intestinal glucose transport and salinity adaptation in a euryhaline teleost. *Am. J. Physiol.* **252**, R567–R578 (1987).
- Hall, J. R., Short, C. E. & Driedzic, W. R. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: Developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J. Exp. Biol.* **209**, 4490–4502 (2006).
- Polakof, S. & Soengas, J. L. Evidence of sugar sensitive genes in the gut of a carnivorous fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **166**, 58–64 (2013).
- Polakof, S., Alvarez, R. & Soengas, J. L. Gut glucose metabolism in rainbow trout: implications in glucose homeostasis and glucosensing capacity. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R19–R32 (2010).
- Soengas, J. L. Contribution of glucose- and fatty acid sensing systems to the regulation of food intake in fish. A review. *Gen. Comp. Endocrinol.* **205**, 36–48 (2014).
- Buddington, R. K. Does the natural diet influence the intestine’s ability to regulate glucose absorption? *J. Comp. Physiol. [B]* **157**, 677–688 (1987).
- Houpe, K. L., Malo, C. & Buddington, R. K. Dietary lipid and intestinal brush border membrane phospholipid fatty acid composition and glucose transport of channel catfish. *Physiol. Zool.* **70**, 230–236 (1997).
- Nordrum, S., Bakke-McKellep, A. M., Kroghdahl, A. & Buddington, R. K. Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **125**, 317–335 (2000).
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. & Want, L. Glucose metabolism and regulation: beyond insulin and glucagon. *Diabetes Spectr.* **17**, 183–190 (2004).
- Yeo, R. & Sawdon, M. Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. *Anaesth. Intensive Care Med.* **14**, 296–300 (2013).
- Kojima, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–660 (1999).
- Miura, T. *et al.* Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* **30**, 758–765 (2009).
- Gutierrez, J. A. *et al.* Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 6320–6325 (2008).
- Yang, J., Brown, M. S., Liang, G., Grishin, N. V. & Goldstein, J. L. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* **132**, 387–396 (2008).
- Müller, T. D. *et al.* Ghrelin. *Mol. Metab.* **4**, 437–460 (2015).
- Kang, K. S., Yahashi, S. & Matsuda, K. Central and peripheral effects of ghrelin on energy balance, food intake and lipid metabolism in teleost fish. *Peptides* **32**, 2242–2247 (2011).
- Delhanty, P. J. D. & van der Lely, A. J. Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides* **32**, 2309–2318 (2011).
- Dezaki, K. Ghrelin function in insulin release and glucose metabolism. *Endocr. Dev.* **25**, 135–143 (2013).
- Fuente-Martín, E. *et al.* Ghrelin regulates glucose and glutamate transporters in hypothalamic astrocytes. *Sci. Rep.* **6**, 23673 (2016).
- Patel, A. D. *et al.* Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regul. Pept.* **134**, 17–22 (2006).
- Cao, C., Chen, Y., Wang, W., Liu, Y. & Liu, G. Ghrelin inhibits insulin resistance induced by glucotoxicity and lipotoxicity in cardiomyocyte. *Peptides* **32**, 209–215 (2011).
- Cruz, S. A., Tseng, Y.-C., Kaiya, H. & Hwang, P. P. Ghrelin affects carbohydrate-glycogen metabolism via insulin inhibition and glucagon stimulation in the zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* **156**, 190–200 (2010).
- Polakof, S., Míguez, J. M. & Soengas, J. L. Ghrelin effects on central glucosensing and energy homeostasis-related peptides in rainbow trout. *Domest. Anim. Endocrinol.* **41**, 126–136 (2011).
- Kaiya, H., Kangawa, K. & Miyazato, M. What is the general action of ghrelin for vertebrates? – Comparisons of ghrelin’s effects across vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **181**, 187–191 (2013).
- Kaiya, H., Kangawa, K. & Miyazato, M. Molecular evolution of GPCR: Ghrelin/ghrelin receptors. *J. Mol. Endocrinol.* **52**, T87–T100 (2014).
- Kaiya, H., Kangawa, K. & Miyazato, M. Ghrelin receptors in non-mammalian vertebrates. *Front. Endocrinol.* **4** (2013).
- Gnanapavan, S. *et al.* The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 2988 (2002).
- Yin, Y., Li, Y. & Zhang, W. The Growth Hormone Secretagogue Receptor: Its Intracellular Signaling and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 4837–4855 (2014).
- Castañeda, T. R., Tong, J., Datta, R., Culler, M. & Tschöp, M. H. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front. Neuroendocrinol.* **31**, 44–60 (2010).
- Grey, C. L. & Chang, J. P. Differential involvement of protein kinase C and protein kinase A in ghrelin-induced growth hormone and gonadotrophin release from goldfish (*Carassius auratus*) pituitary cells. *J. Neuroendocrinol.* **23**, 1273–1287 (2011).
- Hardie, D. G. The AMP-activated protein kinase pathway—new players upstream and downstream. *J. Cell Sci.* **117**, 5479–5487 (2004).
- Kim, M. S. *et al.* The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **18**, 2291–2301 (2004).

44. Mazzocchi, G. *et al.* Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides* **25**, 1269–1277 (2004).
45. Li, Z. *et al.* Ghrelin promotes hepatic lipogenesis by activation of mTOR-PPAR γ signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **111**, 13163–13168 (2014).
46. Moon, T. W. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **129**, 243–249 (2001).
47. Panserat, S., Plagnes-Juan, E. & Kaushik, S. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* **204**, 2351–2360 (2001).
48. Soengas, J. L. & Moon, T. W. Transport and metabolism of glucose in isolated enterocytes of the black bullhead *Ictalurus melas*: effects of diet and hormones. *J. Exp. Biol.* **201**, 3263–3273 (1998).
49. Wright, E. M., Loo, D. D. F. & Hirayama, B. A. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol. Rev.* **91**, 733–794 (2011).
50. Harada, N. & Inagaki, N. Role of sodium-glucose transporters in glucose uptake of the intestine and kidney. *J. Diabetes Investig.* **3**, 352–353 (2012).
51. Moran-Ramos, S., Tovar, A. R. & Torres, N. Diet: friend or foe of enteroendocrine cells—How it interacts with enteroendocrine cells. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* **3**, 8–20 (2012).
52. Gorboulev, V. *et al.* Na(+)-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* **61**, 187–196 (2012).
53. Riley, L. G., Walker, A. P., Dorrough, C. P., Schwandt, S. E. & Grau, E. G. Glucose regulates ghrelin, neuropeptide Y, and the GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **154**, 541–546 (2009).
54. Polakof, S., Mommsen, T. P. & Soengas, J. L. Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **160**, 123–149 (2011).
55. Schwandt, S. E., Peddu, S. C. & Riley, L. G. Differential roles for octanoylated and decanoylated ghrelins in regulating appetite and metabolism. *Int. J. Pept.* **2010**, 1–6 (2010).
56. Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S. & Yada, T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* **52**, 948–956 (2003).
57. Chen, C., Wu, D. & Clarke, I. J. Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J. Endocrinol.* **148**, 381–386 (1996).
58. Au, A., Gupta, A., Schembri, P. & Cheeseman, C. I. Rapid insertion of GLUT2 into the rat jejunal brush-border membrane promoted by glucagon-like peptide 2. *Biochem. J.* **367**, 247–254 (2002).
59. Blanco, A. M., Gómez-Boronat, M., Redondo, I., Valenciano, A. I. & Delgado, M. J. Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Comp. Physiol. [B]* **186**, 727–738 (2016).
60. Sánchez-Bretaña, A. *et al.* *In situ* localization and rhythmic expression of ghrelin and *ghs-r1* ghrelin receptor in the brain and gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*). *PloS One* **10**, e0141043 (2015).
61. Diotel, N. *et al.* Nuclear progesterone receptors are up-regulated by estrogens in neurons and radial glial progenitors in the brain of zebrafish. *PloS One* **6**, e28375 (2011).
62. Stone, D. A. J., Allan, G. L. & Anderson, A. J. Carbohydrate utilization by juvenile silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). I. Uptake and clearance of monosaccharides following intraperitoneal injection. *Aquac. Res.* **34**, 97–107 (2003).
63. Eames, S. C., Philipson, L. H., Prince, V. E. & Kinkel, M. D. Blood sugar measurement in zebrafish reveals dynamics of glucose homeostasis. *Zebrafish* **7**, 205–213 (2010).
64. Sánchez-Bretaña, A. *et al.* Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce *gper1a* and *gper1b* expression and repress *glock1a* and *gbm1a* in the liver of goldfish. *J. Comp. Physiol. [B]* **186**, 73–82 (2016).
65. El-Sabry, A., Soliman, F., Handy, R., Al-Tonsy, M. & Soliman, H. Developing and characterizing of primary intestinal cells culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in studying of copper sulphate and copper nanoparticles accumulation. *Egy J Aquac* **3**, 19–38 (2013).
66. Díaz, M., Antonescu, C. N., Capilla, E., Klip, A. & Planas, J. V. Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells. *Endocrinology* **148**, 5248–5257 (2007).
67. Wang, Q., Khayat, Z., Kishi, K., Ebina, Y. & Klip, A. GLUT4 translocation by insulin in intact muscle cells: detection by a fast and quantitative assay. *FEBS Lett.* **427**, 193–197 (1998).
68. Ramesh, N., Mortazavi, S. & Unniappan, S. Nesfatin-1 stimulates cholecystokinin and suppresses peptide YY expression and secretion in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **472**, 201–208 (2016).
69. Kaiya, H., Miura, T., Matsuda, K., Miyazato, M. & Kangawa, K. Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish. *Carassius auratus*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **327**, 25–39 (2010).
70. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2[−] $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).

Acknowledgements

Authors would like to thank Dr. Eiko Kawamura for his help with confocal microscopy. This work was supported by a Discovery Grant (341292-2012-RGPIN), and Discovery Accelerator Supplement (429436-2012-RGPAS) award from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada, an Establishment grant from Saskatchewan Health Research Foundation (SHRF) and John R. Evans Leaders Fund from the Canada Foundation for Innovation to S. Unniappan, and partly by the Spanish MINECO (AGL2016-74857-C3-2-R) to M.J. Delgado. S. Unniappan is a recipient of the CIHR New Investigator Award. A.M. Blanco is a predoctoral fellow funded by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia. J.I. Bertucci is a predoctoral fellow supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), Argentina. N.R. is a University of Saskatchewan CGSR Dean's Scholarship awardee.

Author Contributions

A.M.B., M.J.D., A.I.V. and S.U. conceived and designed the experiments. A.M.B. and J.I.B. collected the samples and performed the experiments. N.R. conducted the confocal microscopy studies and imaging. A.M.B., J.I.B. and S.U. analyzed the data. All authors approved the final version of the manuscript. S.U. primarily, and M.J.D. partly, secured funding for this research.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing Interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Blanco, A. M. *et al.* Ghrelin Facilitates GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-mediated Intestinal Glucose Transport in Goldfish (*Carassius auratus*). *Sci. Rep.* **7**, 45024; doi: 10.1038/srep45024 (2017).

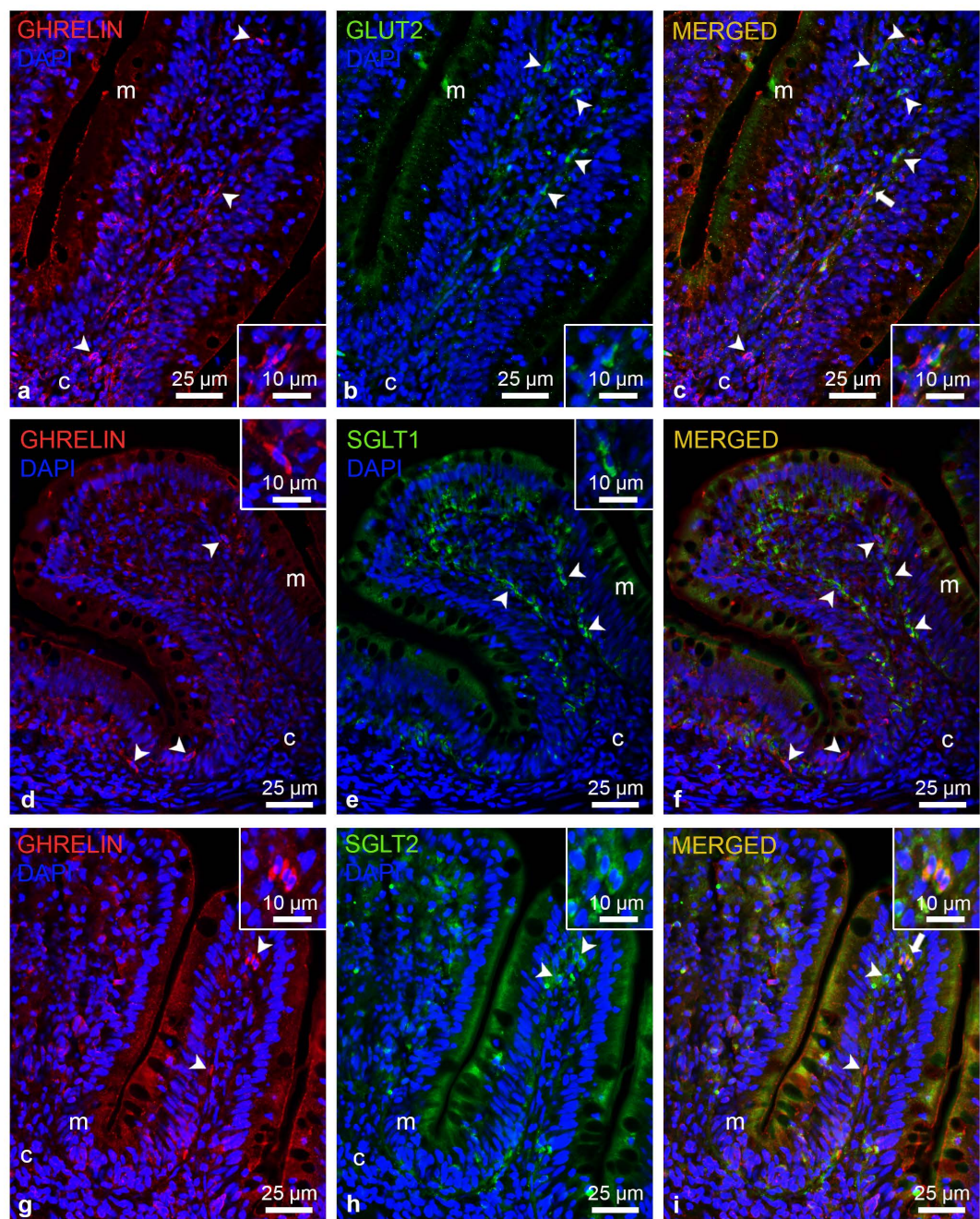
Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



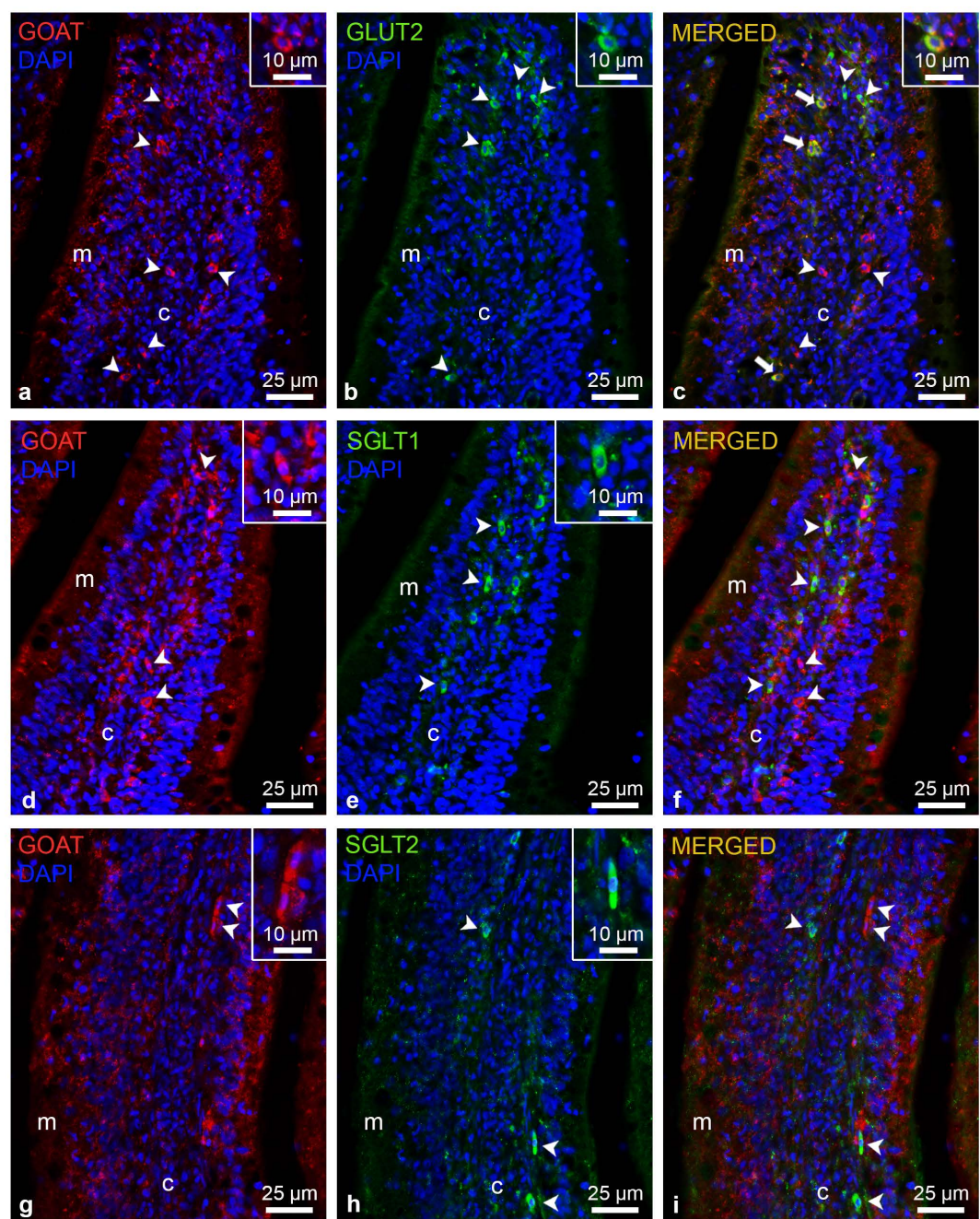
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

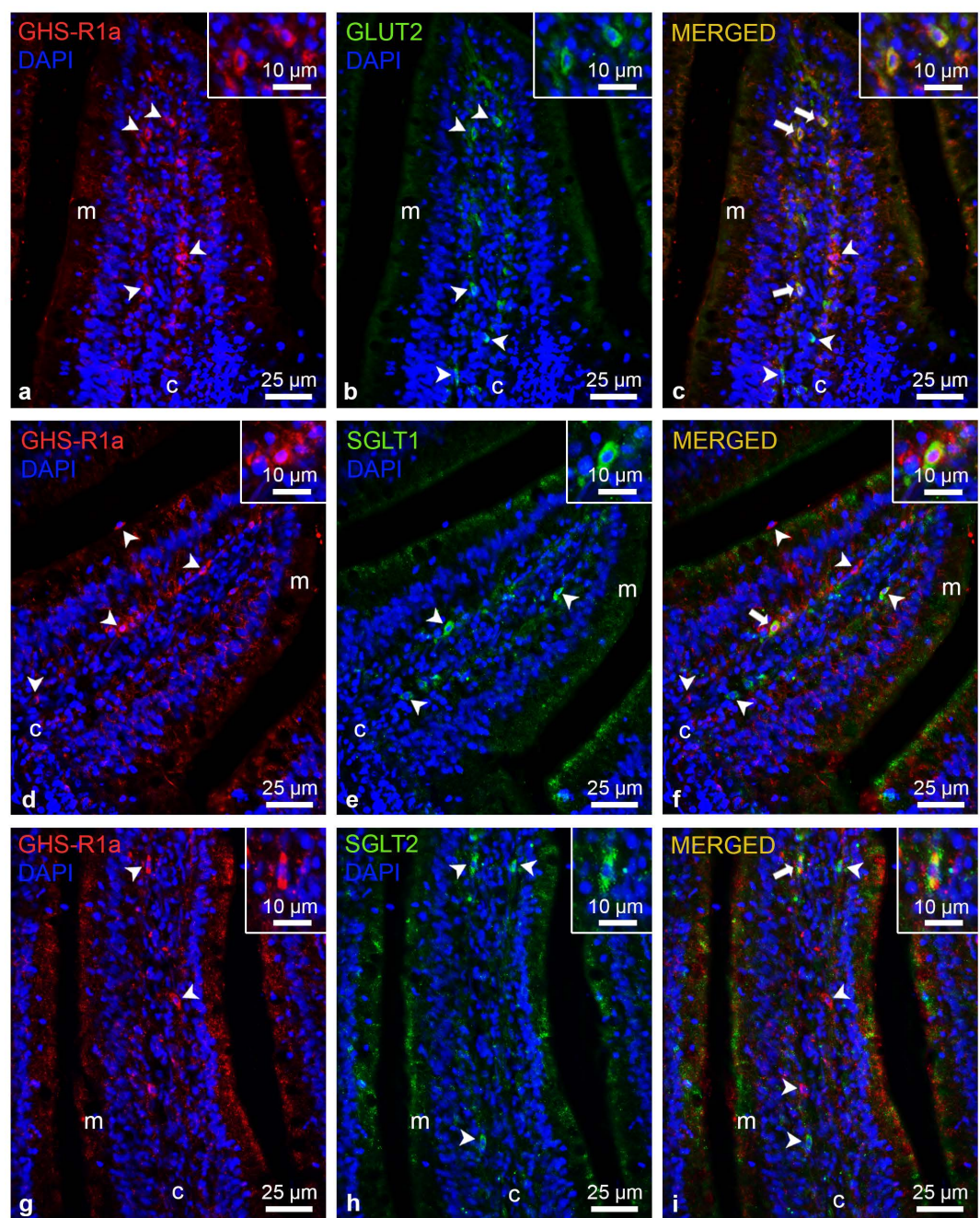
Supplementary information



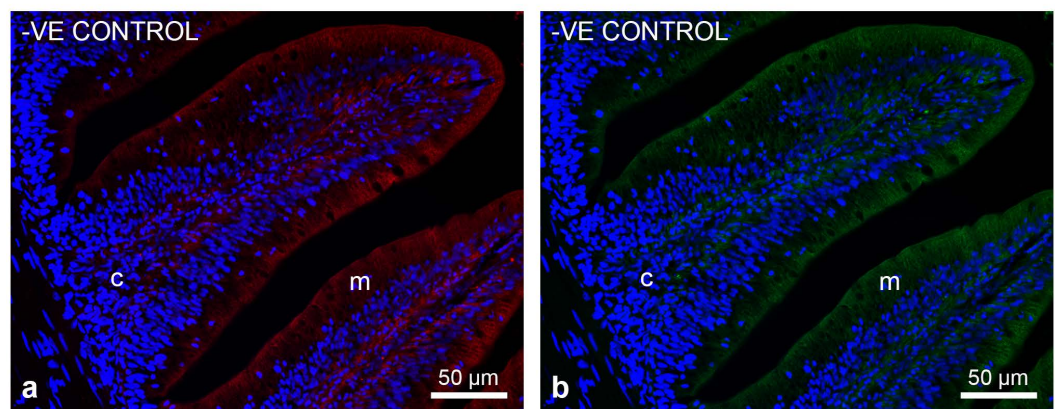
Supplementary Figure S1. Ghrelin-like and GLUT2-like, SGLT1-like and SGLT2-like immunoreactivity in goldfish intestine detected by immunohistochemistry and assessed by fluorescence microscope. Transversal representative sections of intestine showing ghrelin-like (a, d, g; red) and GLUT2-like (b; green), SGLT1-like (e; green) or SGLT2-like (h; green) immunoreactivity, and merged images of ghrelin and each of the glucose transporters (c, f, i; yellow). All images are merged with DAPI showing nuclei in blue. Arrowheads indicate cells stained with either ghrelin or GLUT2, SGLT1 or SGLT2, and solid arrows show cells that colocalize both ghrelin and each of the glucose transporters. A magnified image of representative cells positive to ghrelin and/or the glucose transporters is shown in square inset in each figure. Scale bars (µm) are indicated in each image. c, connective tissue (lamina propria + submucosa); m, mucosa.



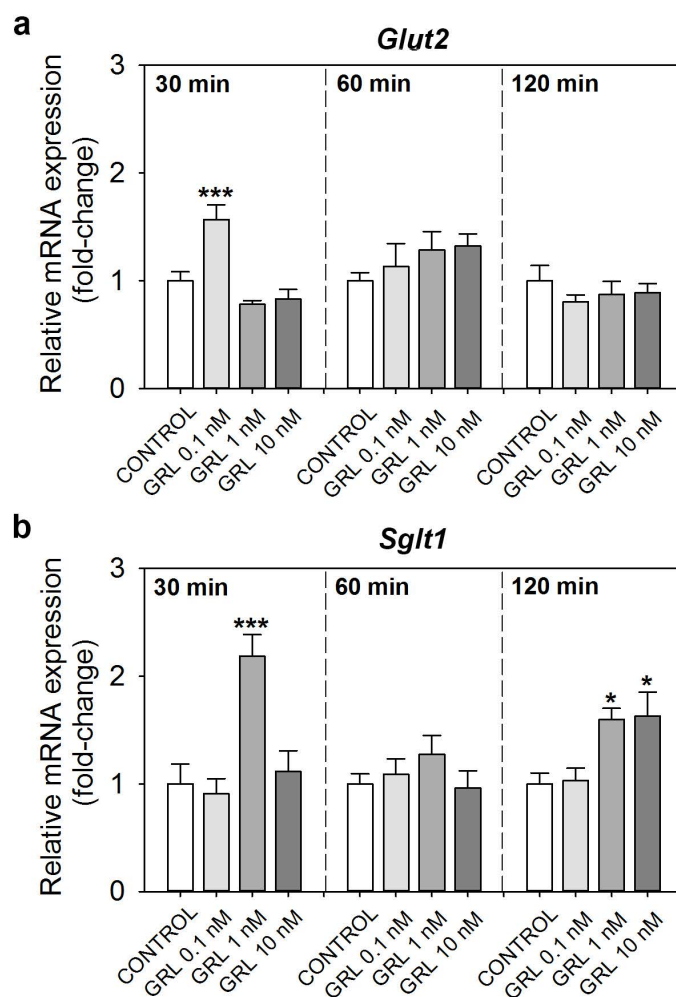
Supplementary Figure S2. GOAT-like and GLUT2-like, SGLT1-like and SGLT2-like immunoreactivity in goldfish intestine detected by immunohistochemistry and assessed by fluorescence microscope. Transversal representative sections of intestine showing GOAT-like (a, d, g; red) and GLUT2-like (b; green), SGLT1-like (e; green) or SGLT2-like (h; green) immunoreactivity, and merged images of GOAT and each of the glucose transporters (c, f, i; yellow). All images are merged with DAPI showing nuclei in blue. Arrowheads indicate cells stained with either GOAT or GLUT2, SGLT1 or SGLT2, and solid arrows show cells that colocalize both GOAT and each of the glucose transporters. A magnified image of representative cells positive to GOAT and/or the glucose transporters is shown in square inset in each figure. Scale bars (μm) are indicated in each image. c, connective tissue (lamina propria + submucosa); m, mucosa.



Supplementary Figure S3. GHS-R1a-like and GLUT2-like, SGLT1-like and SGLT2-like immunoreactivity in goldfish intestine detected by immunohistochemistry and assessed by fluorescence microscope. Transversal representative sections of intestine showing GHS-R1a-like (a, d, g; red) and GLUT2-like (b; green), SGLT1-like (e; green) or SGLT2-like (h; green) immunoreactivity, and merged images of GHS-R1a and each of the glucose transporters (c, f, i; yellow). All images are merged with DAPI showing nuclei in blue. Arrowheads indicate cells stained with either GHS-R1a or GLUT2, SGLT1 or SGLT2, and solid arrows show cells that colocalize both GHS-R1a and each of the glucose transporters. A magnified image of representative cells positive to GHS-R1a and/or the glucose transporters is shown in square inset in each figure. Scale bars (μm) are indicated in each image. c, connective tissue (lamina propria + submucosa); m, mucosa.



Supplementary Figure S4. Specificity of antibodies used in the present study assessed by IHC. Figure shows transversal representative sections of intestine treated only with secondary antibodies (a and b). No staining is detected in no-primary antibody negative controls. Scale bars (μm) are indicated in each image. c, connective tissue (lamina propia + submucosa); m, mucosa.



Supplementary Figure S5. Concentration and time-dependent effects of in vitro treatment with ghrelin (GRL) on the mRNA expression of *glut2* (a) and *sglT1* (b) in goldfish cultured liver. Cultured liver was incubated with DMEM alone (control) or containing different concentrations of ghrelin (0.1, 1 and 10 nM) during 30, 60 and 120 min. Data obtained by RT-qPCR is shown as mean + SEM ($n = 6$ fish). Asterisks denote statistical differences between control and treated groups assessed by ANOVA and Student-Newman-Keuls post-hoc test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).



Ghrelin suppresses cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the intestine, and attenuates the anorectic effects of CCK, PYY and GLP-1 in goldfish (*Carassius auratus*)

Ayelén M. Blanco^{a,b}, Juan I. Bertucci^{b,c}, Ana I. Valenciano^a, María J. Delgado^a, Suraj Unniappan^b

^a Departamento de Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain.

^b Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

^c Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico Chascomús, Chascomús, Buenos Aires, Argentina.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2016

Revised 8 March 2017

ABSTRACT

Ghrelin is an important gut-derived hormone with an appetite stimulatory role, while most of the intestinal hormones, including cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), are appetite-inhibitors. Whether these important peptides with opposing roles on food intake interact to regulate energy balance in fish is currently unknown. The aim of this study was to characterize the putative crosstalk between ghrelin and CCK, PYY and GLP-1 in goldfish (*Carassius auratus*). We first determined the localization of CCK, PYY and GLP-1 in relation to ghrelin and its main receptor GHS-R1a (growth hormone secretagogue 1a) in the goldfish intestine by immunohistochemistry. Colocalization of ghrelin/GHS-R1a and CCK/PYY/GLP-1 was found primarily in the luminal border of the intestinal mucosa. In an intestinal explant culture, a significant decrease in *prepro-cck*, *prepro-pyy* and *proglucagon* transcript levels was observed after 60 min of incubation with ghrelin, which was abolished by preincubation with the GHS-R1a ghrelin receptor antagonist [D-Lys3]-GHRP-6 (except for *proglucagon*). The protein expression of PYY and GLP-1 was also downregulated by ghrelin. Finally, intraperitoneal co-administration of CCK, PYY or GLP-1 with ghrelin results in no modification of food intake in goldfish. Overall, results of the present study show for the first time in fish that ghrelin exerts repressive effects on enteric anorexigens. It is likely that these interactions mediate the stimulatory effects of ghrelin on feeding and metabolism in fish.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Regulation of food intake and energy homeostasis relies on complex interactions between various peripheral components transmitting the metabolic status of the organism, and the central nervous system, responsible for receiving, processing and responding to this information. Among the peripheral signals involved in this process, diverse gastrointestinal peptides are responsible for the short-term control of hunger and satiety (Konturek et al., 2004). One of these gastrointestinal peptides is ghrelin, particularly important for being so far the most potent peripherally-produced peptide exerting a stimulatory effect on food intake (Kaiya et al., 2013a; Kang et al., 2011; Müller et al., 2015). Ghrelin was purified in 1999 from the rat stomach and was described as a 28 amino acid peptide (Kojima et al., 1999), although it is shorter in many species, e.g. goldfish (*Carassius auratus*; Miura et al., 2009). Ghrelin is posttranslationally modified by an acylation catalyzed by ghrelin O-acyltransferase (GOAT) (Gutierrez et al., 2008; Yang et al., 2008), modification that is essential for the peptide to bind to its receptor, the G protein-coupled growth hormone secretagogue receptor (GHS-R) (Kojima et al., 1999).

The orexigenic effects of ghrelin are mainly mediated via central mechanisms located primarily within the hypothalamus in both mammals (Goto et al., 2006; Wang et al., 2014) and fish (Miura et al., 2006). For this, ghrelin, mainly synthesized by enteric endocrine cells, reaches the central nervous system via the circulatory system by crossing the blood-brain barrier (Banks et al., 2002). Apart from secreting into circulation, enteric endocrine cells have been shown to have the potential for a secretory response via an intercellular (paracrine) route. Paracrine mechanisms of action for ghrelin in the intestine has been previously reported, for instance, on the effects of this hormone on cell proliferation in small intestinal IEC-6 cells (Yu et al., 2013).

The existence of paracrine or even autocrine actions for enteric endocrine cells suggests the existence of possible modulatory roles among the different enteric peptides. In mammals, several interactions were reported between ghrelin and peripheral anorexigens (Wisser et al., 2010), which includes cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon like peptide-1 (GLP-1). These hormones are postprandially released by I-cells in the duodenum (Gibbs et al., 1973) and by L-cells in the distal gastrointestinal tract (PYY and GLP-1; Batterham and Bloom, 2003; Holst, 2007). Two forms of PYY are found in circulation in mammals: the full-length form PYY(1-36) and the truncated peptide PYY(3-36) (Ballantyne, 2006). Elevated food intake after peripheral ghrelin administration is antagonized by pre- or simultaneous injection of CCK in rats (Date et al., 2005; Kobelt et al., 2005). Similarly, peripheral ghrelin injections in rats attenuate the inhibition of food intake and gastric emptying induced by

* Corresponding author at: Department of Veterinary Biomedical Sciences, Laboratory of Integrative Neuroendocrinology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, Saskatoon, Saskatchewan S7N 5B4 Canada.

E-mail address: suraj.unniappan@usask.ca (S. Unniappan)

CAPÍTULO 4

*Desarrollo de peces cebras
deficientes de preproghrelina:
caracterización de la generación F0*



CAPÍTULO 4

RESUMEN

La delección génica constituye una herramienta de enorme valor para el estudio de la importancia que el/los gen/es mutados presenta/n en un organismo y los procesos en los cuales están involucrados. En el marco de la presente Tesis Doctoral, nos hemos propuesto iniciar la generación de líneas de peces cebra *knockout* para el gen *preproghrelina* como una herramienta adicional y de relevancia para el estudio de las funcionalidades del sistema ghrelinérgico en los peces teleósteos. Para ello hemos empleado la técnica de manipulación genética CRISPR/Cas9, que permite la edición del material genético de una manera dirigida a una posición específica del ADN de una especie (veánse detalles en el Anexo metodológico VI). La generación de una línea estable de individuos genéticamente modificados con esta técnica requiere una serie de cruces selectivos que permitan una transferencia genética vertical. De modo que los individuos pertenecientes a la tercera generación (F3) son los que constituirían dicha línea estable. Estos procesos de transferencia genética vertical demandan largos periodos de tiempo, pues cada generación de individuos debe alcanzar el estado adulto para poder reproducirse. En esta fase final de redacción de la presente Tesis Doctoral, estos cruces selectivos se están llevando a cabo. Los trabajos presentados a continuación se han realizado utilizando ejemplares de peces cebra pertenecientes a la primera generación (F₀), también llamados fundadores. Estos peces presentan una mutación en el gen de *preproghrelina*, aunque ésta puede diferir entre los individuos, dependiendo de cuáles hayan sido los mecanismos de reparación del ADN que se hayan desencadenado en cada ejemplar tras el daño producido al material genético.

En este contexto, hemos llevado a cabo un estudio preliminar para analizar los niveles de expresión de diversos genes de interés en el marco de la presente Tesis, en individuos

genéticamente modificados para el gen de la *preproghrelina* e individuos salvajes o *wild type*. Para ello, un grupo de 8 ejemplares salvajes y otro de 8 ejemplares genéticamente modificados, aclimatados a un fotoperiodo 14L:10D y alimentados diariamente a las 14:00 (ZT-7), fueron sacrificados a la hora habitual de alimentación. A continuación, se tomaron muestras de cerebro, intestino e hígado para medir la expresión de *preproghrelina* y *goat*, así como de genes codificantes para algunos reguladores del apetito (*npv*, *agrp*, *pomc*, *cart*, *prepro-cck* y *proglucagón*), enzimas digestivas (*sacarasa-isomaltasa*, *aminopeptidasa A*, *tripsina* y *lipoproteína lipasa*) y transportadores de glucosa (*glut2* y *sglt1*) mediante RT-qPCR (veáanse los detalles en el Anexo metodológico II). Asimismo, se realizaron tinciones inmunohistoquímicas de secciones intestinales para evaluar la presencia/ausencia de ghrelina en los diferentes grupos (veáanse los detalles en el Anexo metodológico IV). El diseño experimental utilizado se muestra en la **Figura 27**.



Figura 27. Diseño experimental utilizado en el estudio comparado entre ejemplares de pez cebra salvajes (WT) y *knockdown* (KD) del gen *preproghrelina*.

Los resultados de este estudio evidencian claramente que los peces genéticamente modificados presentan niveles significativamente menores de ARNm codificante para ghrelina que los individuos salvajes en los tres tejidos analizados (cerebro, intestino e hígado), confirmando que la técnica de CRISPR/Cas9 ha sido capaz de producir una mutación en el gen de interés. Sin embargo, no se ha conseguido eliminar por completo la expresión del gen sino que se ha obtenido una reducción de la misma (en un 60-70%), como cabría esperar en una generación F_0 , por lo que nos referiremos a estos individuos genéticamente modificados como individuos *knockdown* (en lugar de *knockout*). Las inmunotinciones realizadas en secciones intestinales pusieron de manifiesto que la presencia de la proteína ghrelina en el intestino también es considerablemente menor en los individuos *knockdown* que en los salvajes, observándose en los primeros únicamente alguna célula dispersa en la mucosa que expresa la hormona (**Figura 28**). Junto al silenciamiento de la *preproghrelina*, los peces *knockdown* muestran una reducción en los transcritos de *goat* tanto en el cerebro como en el intestino y el hígado (**Figura 28**), probablemente como un mecanismo de control de niveles excesivos de enzima cuando su sustrato se encuentra en niveles muy bajos.

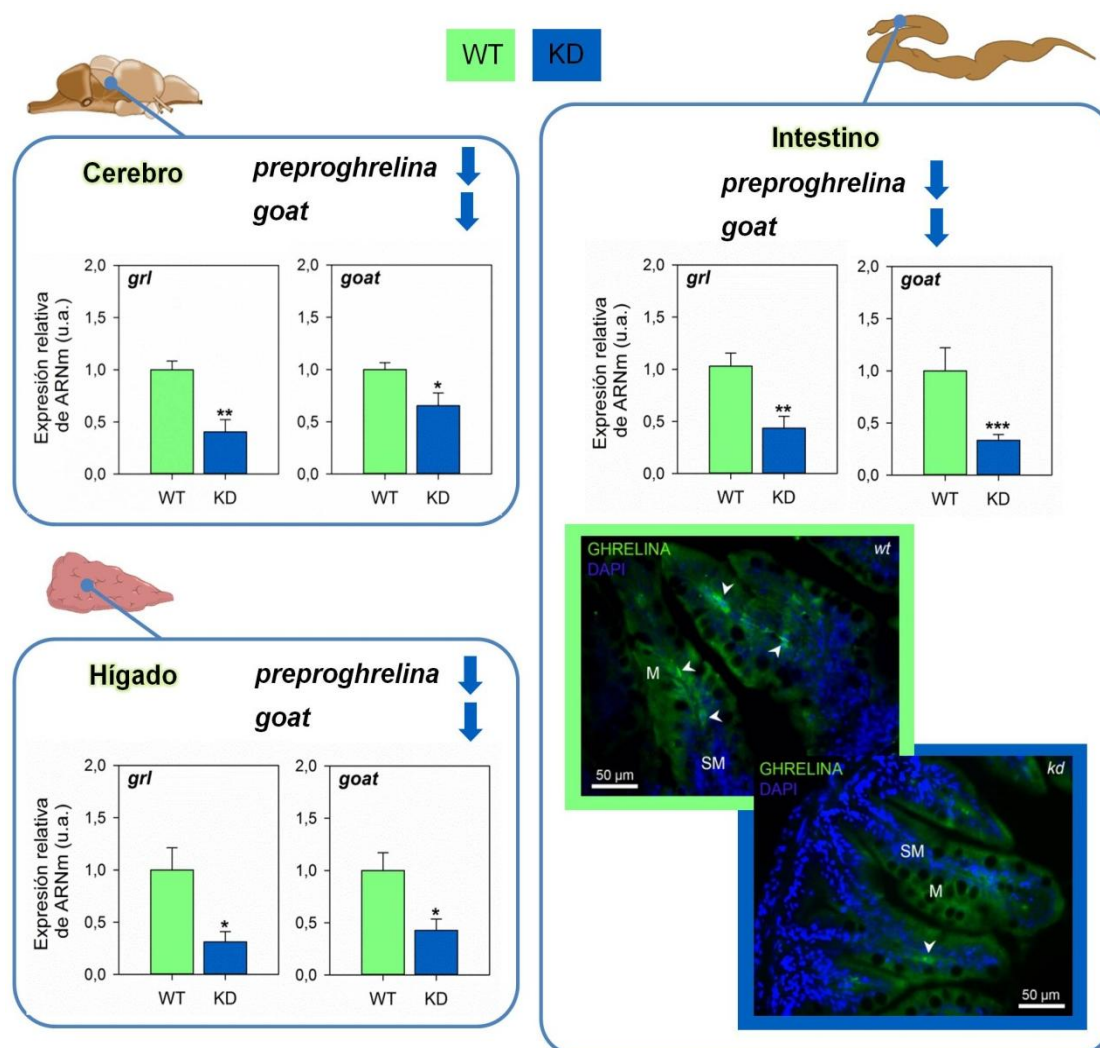


Figura 28. Resultados obtenidos en los análisis de expresión génica y proteica de ghrelina y GOAT en peces cebra salvajes (WT) y *knockdown* (KD). ↓: reducción significativa de los niveles génicos. Los datos se expresan como media + error estándar (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y KD (ANOVA y Student-Newman-Keuls; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). Las fotografías corresponden a secciones transversales de intestino mostrando inmunorreactividad para ghrelina (verde). La tinción azul (DAPI) muestra los núcleos. Las puntas de flecha señalan células positivas a ghrelina. GOAT, ghrelina O-aciltransferasa; GRL, ghrelina; M, mucosa; SM, submucosa.

En cuanto a los reguladores del apetito, hemos observado que la mayoría de las principales hormonas encargadas de la regulación de la ingesta en el cerebro modifican su expresión ante el silenciamiento génico de la ghrelina. Así, los peces cebra *knockdown* para ghrelina muestran niveles de transcritos de *agrp* mayores (114%) y de *pomc* y *cart* menores (45% y 25%, respectivamente) que los peces salvajes. No se han observado diferencias entre los dos grupos en la expresión cerebral de *npv*. A nivel intestinal, los niveles de *prepro-cck*, *prepro-pyy* y *proglucagón* se encuentran disminuidos (60-70%) en los individuos *knockdown* en comparación con los salvajes (**Figura 29**).

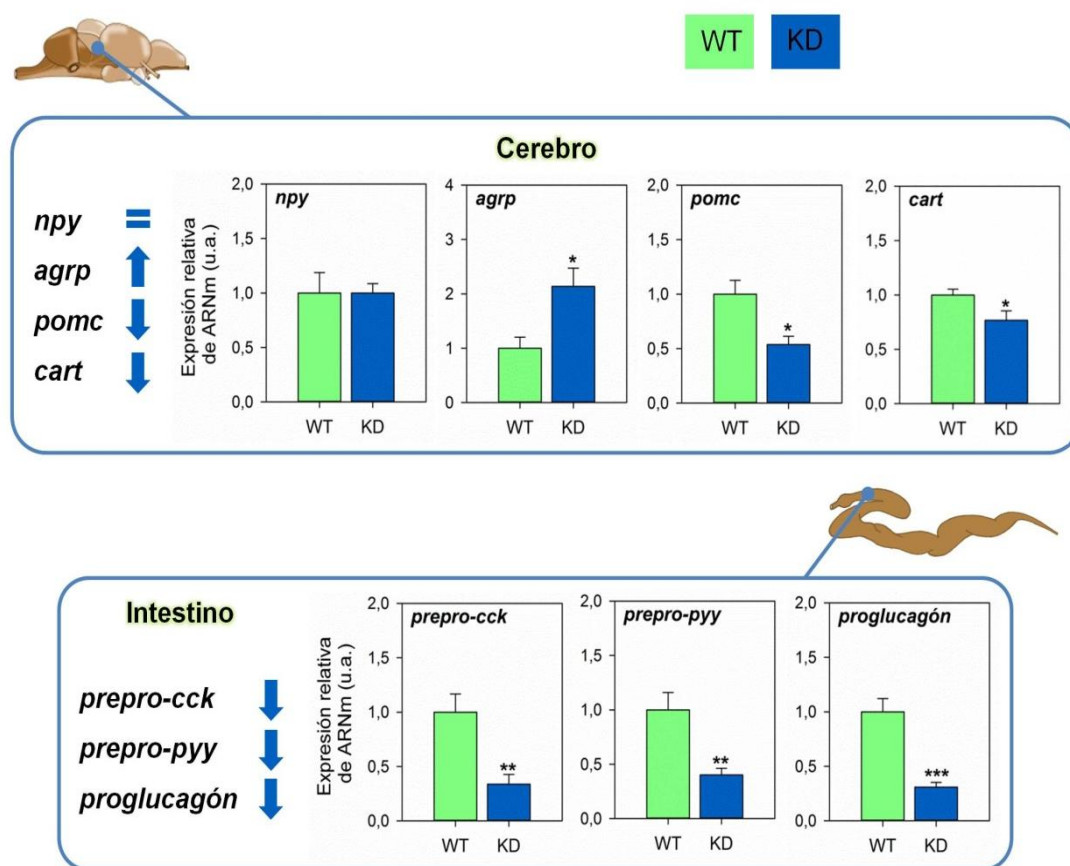


Figura 29. Resultados obtenidos en los análisis de expresión génica de reguladores del apetito en peces cebra salvajes (WT) y *knockdown* (KD). =: niveles génicos no modificados, ↑: incremento significativo, ↓: reducción significativa. Los datos se expresan como media + error estándar (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y KD (ANOVA y Student-Newman-Keuls; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001). AgRP, péptido relacionado con agouti; CART, transcrito regulado por amfetamina y cocaína; prepro-CCK, precursor de colecistocinina; NPY, neuropéptido Y; POMC, proopiomelanocortina; prepro-PYY, precursor de péptido tirosina-tirosina.

Por último, los análisis cuantitativos de la expresión génica de enzimas digestivas y transportadores de glucosa han revelado que el silenciamiento génico de la *preproghrelina* también produce importantes cambios en los niveles de expresión de estos genes. En concreto, hemos observado que la mutación de este gen conduce a una reducción significativa en los niveles de *sacarasa-isomaltasa* y *aminopeptidasa A* en el intestino (en un 35% y un 45%, respectivamente) y de *lipoproteína lipasa* en el hígado (en un 50%). No se encontraron diferencias significativas entre peces *knockdown* y salvajes en la expresión de *lipoproteína lipasa* en intestino y de *sacarasa-isomaltasa* y *tripsina* en el hígado (**Figura 30**). Por otra parte, tanto el transportador de glucosa *glut2* como *sgl1* muestran niveles de expresión menores (45-65%) en los individuos *knockdown* que en los salvajes tanto en el intestino como en el hígado (**Figura 31**).

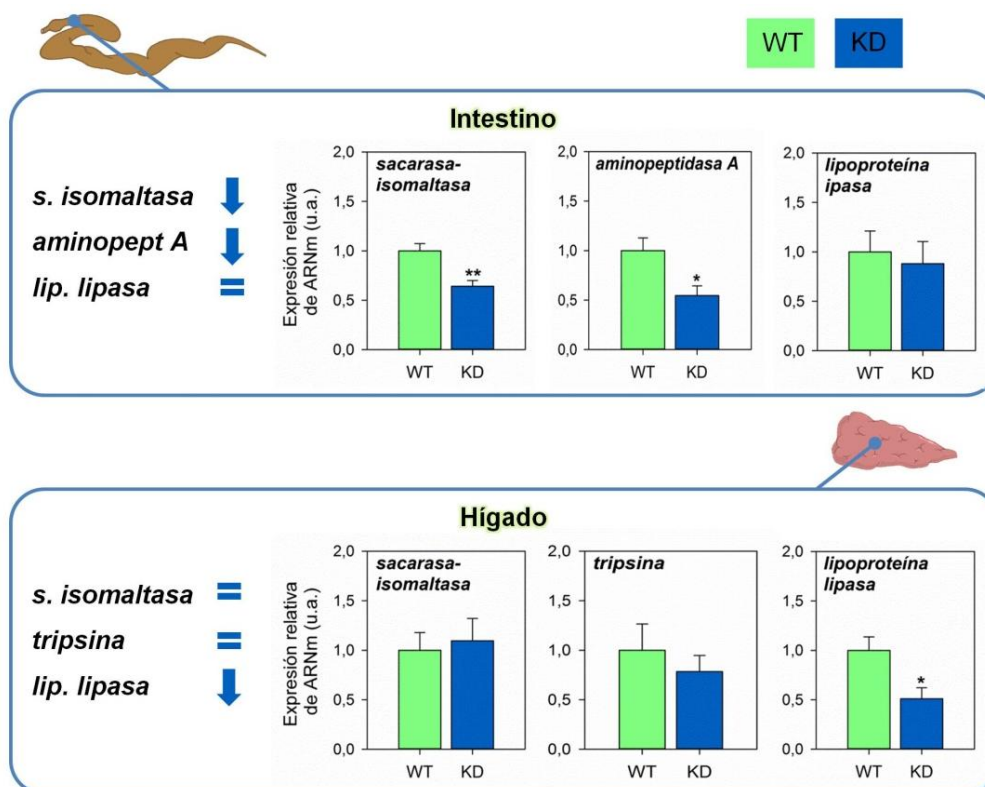


Figura 30. Resultados obtenidos en los análisis de expresión génica de enzimas digestivas en peces cebra salvajes (WT) y *knockdown* (KD). =: niveles génicos no modificados, ↓: reducción significativa. Los datos se expresan como media + error estándar (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y KD (ANOVA y Student-Newman-Keuls; * p < 0,05, ** p < 0,01).

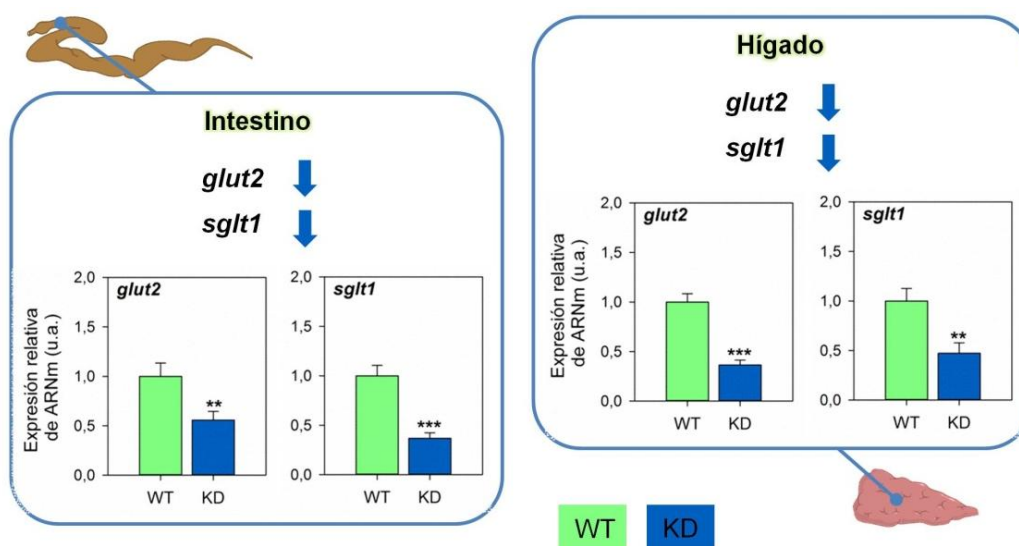


Figura 31. Resultados obtenidos en los análisis de expresión génica de transportadores de glucosa en peces cebra salvajes (WT) y *knockdown* (KD). ↓: reducción significativa de los niveles génicos. Los datos se expresan como media + error estándar (n = 8). Los asteriscos indican diferencias significativas entre WT y KD (ANOVA y Student-Newman-Keuls; ** p < 0,01, *** p < 0,001). GLUT2, transportador de glucosa por difusión facilitada de tipo 2; SGLT1, cotransportador sodio-glucosa de tipo 1.

En conclusión, los resultados presentados en este Capítulo 4 muestran que el silenciamiento génico de la *preproghrelina* en ejemplares de peces cebra conduce a importantes alteraciones en la expresión de numerosos genes, en concreto al menos de importantes reguladores del apetito, enzimas digestivas y transportadores de glucosa. Estos resultados apoyan el importante papel de la ghrelina en la alimentación, reforzando las funciones sugeridas para esta hormona en el Capítulo 3 relativas a un papel modulador en la digestión y la absorción de nutrientes.



DISCUSIÓN

En la presente Discusión, se pretenden destacar las principales ideas sobre la regulación y el funcionamiento del sistema ghrelinérgico en el carpín derivadas de la visión general de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos que constituyen esta Tesis Doctoral. Asimismo, se discuten cuestiones aún no resueltas, que podrían ser consideradas en estudios futuros acerca del sistema ghrelinérgico en teleósteos y su implicación en la regulación de la ingesta y el balance energético.

1. LA GOAT, UN ELEMENTO CLAVE EN EL SISTEMA GHRELINÉRGICO

Una característica estructural peculiar de la ghrelina es que su forma activa requiere la unión de un ácido graso de cadena media a la molécula, tratándose de la única hormona de origen periférico conocida hasta la actualidad con esta modificación (Kaiya *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2012; Kojima *et al.*, 2016). La necesidad de esta modificación postraducciona para la activación de la ghrelina y su unión a su principal receptor ha despertado un gran interés por el estudio de la enzima encargada de producir tal modificación, la GOAT. Pese al avance acerca del funcionamiento y regulación de la GOAT que ha tenido lugar en los últimos años en mamíferos, muy poco se conoce de esta enzima en teleósteos. Los resultados presentados en el capítulo 1 de la presente Tesis Doctoral ofrecen información acerca de la GOAT del carpín en relación a su secuencia génica, análisis estructural, distribución y regulación, lo que supone un avance importante en el conocimiento del sistema ghrelinérgico de los teleósteos.

Los trabajos realizados nos permitieron identificar dos transcritos de *goat* en el carpín:

goat-V1 (de 1491 pb) y la variante de *splicing goat-V2* (de 1413 pb), capaces de codificar para proteínas de 393 y 367 aminoácidos, respectivamente (Blanco *et al.*, 2017c). Los alineamientos de secuencias y análisis filogenéticos realizados revelan que los marcos abiertos de lectura (ORFs) de las secuencias de *goat* identificadas son ligeramente más cortos que los de otras especies, como el pez cebra (1248 pb), el ratón (1308 pb) y el humano (1308 pb), y además la porción inicial de los mismos difiere considerablemente con estas otras especies y en general con la secuencia de *goat* de cualquier otro vertebrado. Estas diferencias se deben a que, aunque en la mayoría de las especies estudiadas la estructura del gen que codifica para GOAT consta de 3 exones y 2 intrones (Gutiérrez *et al.*, 2008), en el genoma del carpín, así como en el de al menos las tres especies de teleósteos analizadas *in silico* (carpa común, barbo asiático y pez cebra), el gen de *goat* tiene cuatro exones (a los que hemos llamado 1', 1, 2 y 3) y tres intrones (1', 1 y 2). Hasta la fecha, en la mayoría de los vertebrados estudiados se ha encontrado que los exones 1, 2 y 3 de la *goat* se transcriben para dar lugar al ARNm que posteriormente dará lugar a la proteína GOAT; sin embargo, en el carpín hemos observado que son los exones 1', 2 y 3 los que son transcritos. Estos resultados no excluyen que en el carpín se puedan transcribir alternativamente también los exones 1-2-3 pero, si esto ocurre, dicho transcrito ha de ser minoritario en los tejidos que hemos analizado, ya que no hemos sido capaces de detectarlo en ninguno de ellos. También cabe la posibilidad de que el transcrito 1-2-3 se exprese en algún tejido que no hayamos analizado, como la piel o las células sanguíneas, o en fases embrionarias o larvarias.

Los exones 1' y 1 poseen una secuencia nucleotídica considerablemente diferente y también varían notoriamente en su tamaño (23 pb el exón 1' y 125 el exón 1), lo que da lugar a que el ORF del ARNm del carpín sea más corto que el del resto de vertebrados y con una secuencia inicial considerablemente diferente. En la GOAT típica de la mayoría de vertebrados, la traducción proteica del gen de *goat* comienza en un codón de inicio (ATG) situado en el exón 1, que no está presente en los ARNm del carpín. Esto implica la existencia de codones de inicio alternativos que puedan ser empleados para la traducción proteica en esta especie. Tanto la *goat-V1* como la *goat-V2* poseen un triplete ATG al inicio del exón 1' que marcaría el inicio de la traducción. Además, en la forma primera (aunque no en la segunda) está presente un ATG en el exón 2, el cual en el ratón ha sido identificado como un codón de inicio alternativo de traducción de GOAT funcional (Taylor *et al.*, 2013). Esta observación en mamíferos indica claramente que no existe un único codón de inicio en la secuencia de *goat* capaz de dar lugar a una proteína funcional, lo que apunta a que los dos ARNm identificados en el carpín serían capaces de generar proteínas funcionales.

La evolución de los peces teleósteos incluyó un fenómeno de duplicación génica (3R) que dio lugar a la aparición de copias extra de cada gen (Vandepoele *et al.*, 2004; Dehal y Boore, 2005). A lo largo de la evolución, algunas de estas copias extra se han alterado y convertido en copias no funcionales (pseudogenes), otras se han perdido y, en muchos casos, ambas copias permanecen debido a los fenómenos de subfuncionalización y neofuncionalización (Crow y Wagner, 2006). En el caso de los genes de *goat*, tal y como demuestra el análisis filogenético que hemos llevado a cabo, parece que la segunda copia génica que deberían presentar todos los teleósteos se ha perdido a lo largo de la evolución, ya que únicamente una copia ha sido encontrada en todas las especies estudiadas. Únicamente las especies pertenecientes a la subfamilia *Cyprininae*, que experimentaron una duplicación genómica adicional (4R) (Larhammar y Risinger, 1994; Meyer y Schartl, 1999), poseen una segunda copia del gen. Esta segunda copia parece ser funcional en las especies de la tribu Barbini (como el barbo asiático), ya que presenta una estructura semejante a la copia inicial. Sin embargo, en especies de la tribu Cyprinini (como la carpa común), la estructura de la segunda copia de *goat* está muy alterada (contiene un intrón adicional, deleciones nucleotídicas que alteran el marco de lectura y un codón de terminación prematuro), lo que lleva a pensar que ha perdido su funcionalidad y está presente como un pseudogen. Si bien en nuestros estudios no hemos observado evidencia experimental de la presencia del segundo gen de *goat* en el carpín, su clasificación dentro de la tribu Cyprinini junto a la carpa común, indica que esta especie tendría también una segunda copia génica de *goat* que podría haberse pseudogenizado.

La GOAT es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico. En mamíferos, dicha proteína consta de 11 dominios transmembrana y un bucle reentrante conectados por 11 bucles expuestos. El extremo N-terminal de la proteína está situado en el lado luminal y el C-terminal en el lado citosólico de la membrana del retículo (Taylor *et al.*, 2013). Los resultados de topología obtenidos en la presente Tesis Doctoral indican que la variante GOAT-V1 presenta 11 dominios transmembrana y la GOAT-V2 9 (Blanco *et al.*, 2017c), lo que concuerda con las observaciones en mamíferos, teniendo en consideración que el ARNm de *goat* en el carpín transcribe el exón 1' (más corto que el típico exón 1). Asimismo, cabe destacar que la posición de los dos residuos catalíticos claves para la funcionalidad de la GOAT (asparagina 307 e histidina 338 - numeración en base a las secuencias de mamíferos) se encuentra conservada en el carpín. El hecho de que la histidina esté segregada hacia el lado luminal de la membrana del retículo endoplásmico es consistente con la hipótesis de que el sitio activo de todas las enzimas de la familia de las MBOATs (incluida la GOAT) se encuentra en la cara luminal. Por el contrario, que la asparagina se

encuentre en el lado citosólico de la membrana del retículo sugiere que dicho aminoácido no está directamente implicado en la catálisis, sino que estaría asumiendo otra funcionalidad clave, como podría ser la interacción con el sustrato, el transporte del mismo o la estabilidad estructural de la proteína, entre otras (Taylor *et al.*, 2013).

Otro aspecto importante a discutir es la presencia o ausencia de un péptido señal en las secuencias de GOAT. En el carpín, los resultados obtenidos apuntan a la ausencia de péptido señal en la GOAT-V1, en concordancia con las observaciones en mamíferos (Taylor *et al.*, 2013), pero sugieren la presencia de uno de ellos en la GOAT-V2 (Blanco *et al.*, 2017c). Considerando que la secuencia señal es un factor determinante en la interacción de las proteínas con los sistemas de transporte y, por tanto, crucial para el destino de las mismas, el hecho de que una de las variantes de GOAT del carpín parezca disponer de una de estas secuencias, pero la otra no, podría estar indicando que, en esta especie, las dos formas de la enzima presentan una localización subcelular diferente. Estudios adicionales son necesarios para confirmar esta hipótesis, que sugiere una diferenciación funcional entre las dos variantes de GOAT del carpín. Diferentes observaciones en esta Tesis nos han llevado a sugerir que la ghrelina no es el único sustrato de la GOAT del carpín; en relación a esto cabe la posibilidad de que la ghrelina sea acilada por la GOAT presente en el retículo endoplásmico, pero que estos posibles sustratos distintos a ghrelina sean modificados por una variante de la enzima con distinta localización. Este aspecto de la GOAT del carpín, junto con la complejidad de su secuencia, sugieren que se trata de una enzima compleja de la cual probablemente existan más variantes de las que se han encontrado en este trabajo y cuyo estudio profundo podría abrir importantes puertas al entendimiento del funcionamiento del sistema ghrelinérgico en los peces.

En el carpín, la GOAT muestra una distribución tisular amplia en el carpín, estando presente ambas variantes de la enzima (V1 y V2) en numerosas localizaciones centrales y periféricas (Blanco *et al.*, 2017c). Amplios patrones de distribución de GOAT también se han descrito en otras especies de teleósteos, como el pez cebra (Hatef *et al.*, 2015), en aves (Ma *et al.*, 2015) y en mamíferos (González *et al.*, 2008) incluyendo el humano (Gutiérrez *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2011). La amplia distribución de la GOAT está en concordancia con la distribución de ghrelina (Gnanapavan *et al.*, 2002; Unniappan *et al.*, 2002; Kaiya *et al.*, 2003a; Ghelardoni *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2015), apoyando el importante papel de la enzima en la funcionalidad de esta hormona. No obstante, la distribución de GOAT es más amplia que la de ghrelina en la mayoría de las especies estudiadas, lo que proporciona un primer indicio de que la enzima podría estar actuando sobre otros sustratos diferentes a la ghrelina.

Una de las localizaciones donde la enzima presenta sus mayores niveles de expresión génica es el tracto intestinal, incluidos el esófago, el bulbo intestinal y el intestino anterior y medio, en concordancia con el hecho de que el estómago o la porción anterior del tracto intestinal son los lugares principales de síntesis de ghrelina (Kojima *et al.*, 1999; Unniappan *et al.*, 2002), y reforzando la necesidad de la GOAT para activar la hormona sintetizada. La colocalización de ghrelina y GOAT detectada en el presente trabajo en numerosas células del intestino del carpín apoya esta propuesta. Sin embargo, no todas las células intestinales que contienen GOAT expresan a su vez ghrelina (resultados de esta Tesis; Hatéf *et al.*, 2015; Stengel *et al.*, 2010), lo que apoya la existencia de otros sustratos endógenos para la GOAT. Por ejemplo, en los últimos años se ha sugerido que una variante de *splicing* de ghrelina denominada In1-ghrelina podría ser otro sustrato primario de la GOAT en tejidos humanos, puesto que sus niveles de expresión se encuentran positivamente correlacionados con los de la enzima (Gahete *et al.*, 2011).

Otra localización periférica donde la *goat* se expresa en abundancia en el carpín son las gónadas, donde su presencia podría estar relacionada con el papel modulador del sistema ghrelinérgico en la reproducción, como se ha sugerido previamente en el pez cebra (Shepperd *et al.*, 2012). Esta acción del sistema ghrelinérgico sobre la reproducción también se ve reforzada con la elevada expresión de *goat* en la hipófisis, órgano clave en la regulación de la reproducción a través del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Asimakopoulou, 2012). En este sentido, la presencia de *goat* en esta glándula apoya una activación funcional de la ghrelina con el fin de intervenir en la regulación de la producción de hormonas hipofisarias, como de forma particular se ha mostrado para la hormona de crecimiento en distintos vertebrados (Kojima *et al.*, 1999; Unniappan y Peter, 2004; Casanueva y Diéguez, 2005; Carreira *et al.*, 2013) y para la hormona luteinizante en los peces (Unniappan y Peter, 2004).

Finalmente, a nivel periférico destacaremos la expresión de GOAT en el hígado, que la interpretamos como un hallazgo relevante en relación con la descripción de algunas implicaciones de la ghrelina en este órgano, como por ejemplo en el control del metabolismo lipídico en mamíferos (Barazzoni *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014; Stasi y Milani, 2016) y en algunos peces (Jönsson, 2013; Velasco *et al.*, 2016b), como moduladora del funcionamiento del reloj hepático en el carpín (Nisembaum *et al.*, 2014a; Sánchez-Breña *et al.*, 2017) o en la regulación de la expresión de enzimas digestivas hepáticas (Blanco *et al.*, 2017b). De forma interesante, aunque las dos formas de GOAT se expresan de forma similar en la mayoría de los tejidos estudiados del carpín, cabe destacar que el hígado (y el intestino posterior) muestra mayor expresión de *goat-V1* que de *goat-V2*, mientras que ocurre lo contrario en el riñón cefálico, lo que puede estar indicando que la GOAT-V1 sería la forma implicada en las

acciones de la ghrelina en el hígado y el intestino posterior, mientras que las acciones ejercidas por el sistema ghrelinérgico a nivel del riñón cefálico estarían mediadas por la variante V2.

A nivel central, la amplia expresión génica y proteica de la GOAT en el cerebro del carpín (Blanco *et al.*, 2016c) concuerda con el único estudio realizado en peces, concretamente en el pez cebra (Hatef *et al.*, 2015), pero difiere de la situación en los mamíferos, donde la expresión de *Goat* parece restringirse al hipotálamo (González *et al.*, 2008). La presencia de GOAT en el cerebro sugiere la posibilidad de una acilación local de ghrelina permitiendo la activación de receptores centrales. En este sentido, cabe destacar que, si bien la ghrelina es sintetizada fundamentalmente en el tracto gastrointestinal y alcanza el cerebro a través de la barrera hematoencefálica, se ha descrito la síntesis de una pequeña proporción de esta hormona en el cerebro de rata, fundamentalmente en el hipotálamo, aunque también en otras áreas fuera del mismo (Ferrini *et al.*, 2009). Por tanto, la presencia central de GOAT podría estar relacionada no sólo con la activación de ghrelina de origen gastrointestinal, sino también de la propia ghrelina de origen central.

Un resultado interesante de la presente Tesis Doctoral es la intensa expresión de GOAT en el lóbulo vagal del carpín (Blanco *et al.*, 2016c). Además, el hecho de que la expresión de los diferentes subtipos de receptores ghrelinérgicos en esta área encefálica se modifique por el ayuno (Blanco *et al.*, 2016b) lo posiciona como un área clave para la ghrelina en las respuestas centrales a la ingestión o falta de alimento. Hay que tener presente que el lóbulo vagal está constituido por una capa exterior sensorial, una zona central de fibras y una capa interna de neuronas vagales motoras (Morita *et al.*, 1983), y que forma parte del sistema gustativo del carpín, implicado en las decisiones de palatabilidad que conducen al rechazo de alimentos o a su deglución. También, ha sido implicado en la capacidad del carpín para separar el alimento del sustrato, especialmente durante la captura de alimento del fondo (Morita y Finger, 1985; Finger, 2008). Por tanto, nuestros resultados apoyan una posible participación del sistema ghrelinérgico en la regulación del sistema gustativo del carpín, hipótesis reforzada por la detección de importantes niveles de GOAT en el tracto gustativo secundario de esta especie (Blanco *et al.*, 2016c). La descripción de células inmunorreactivas a ghrelina en el lóbulo, nervio y epitelio olfatorios, y en células de la cavidad bucal del fletán durante el desarrollo temprano (Einarsdóttir *et al.*, 2011), así como el hecho de que ratones *knockout* para el receptor de ghrelina muestren una sensibilidad reducida a compuestos salados y agrios (Shin *et al.*, 2010), apoyan esta implicación de la ghrelina en la percepción de señales químicas, incluida la detección de alimento.

Otras posibles funcionalidades aún no exploradas para el sistema ghrelinérgico de los peces que surgen del perfil de expresión de GOAT son, por ejemplo, un rol en el sistema vestibular y en la percepción del dolor. La participación en el sistema vestibular estaría sugerida por los altos niveles de GOAT detectados en el fascículo longitudinal medial y en axones de células de Mauthner, mientras que la presencia de GOAT en el tracto espinotalámico (que junto al trigeminal constituyen las principales vías sensitivas nociceptivas) induce a pensar en una posible implicación en mecanismos nociceptivos. Las vías sensitivas ascendentes de dolor y temperatura del tracto espinotalámico envían la información al *griseum centrale*, área en la que también observamos una señal intensa de GOAT. Hasta la fecha, no existen estudios sobre posibles funciones del sistema ghrelinérgico en la mediación de los reflejos vestibulares o en el sistema nociceptivo de los teleósteos, pero las observaciones de la presente Tesis Doctoral proporcionan indicios de posibles papeles novedosos, aún sin estudiar, de este sistema en los peces. Estas hipótesis estarían respaldadas por observaciones en mamíferos, en los que la ghrelina participa en el alivio del dolor (Sibilia *et al.*, 2006, Zhou *et al.*, 2014b; Liu *et al.*, 2016), así como en la regulación de la temperatura corporal (Wiedmer *et al.*, 2011; Tokizawa *et al.*, 2012).

Considerables niveles de GOAT se han detectado en otras regiones del cerebro del carpín, como el telencéfalo y el hipotálamo (Blanco *et al.*, 2016c). Teniendo presente el papel clave que estas regiones desempeñan en la regulación de la ingesta en los peces (Delgado *et al.*, *under review*), la presencia en ellas de GOAT y de su principal receptor, *ghs-rla* (Sánchez-Breñaño *et al.*, 2015b), confirman la importancia funcional de la ghrelina en el control del apetito. Además, las observaciones realizadas en esta Tesis Doctoral en relación con las alteraciones de la expresión de varios componentes del sistema ghrelinérgico (*preproghrelina*, *goat* y *ghs-r*) por la alimentación o los períodos de ayuno (Blanco *et al.*, 2016b) en el telencéfalo refuerzan la importancia de esta área en procesos relacionados con la alimentación. Finalmente, cabe indicar que el perfil de expresión de GOAT en áreas del cerebro anterior del carpín coincide con el descrito para otros reguladores del apetito en los peces, como el NPY (Kah *et al.*, 1989; Cerdá-Reverter *et al.*, 2000) y la orexina (Kaslin *et al.*, 2004; Panula, 2010), apoyando estudios previos que apuntan a la existencia de interacciones fisiológicas centrales entre el sistema ghrelinérgico y otros agentes orexigénicos (Guan *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2006; 2007). En este sentido, esta Tesis Doctoral avanza un poco más en el conocimiento, ampliando esta interacción de ghrelina con otros reguladores del apetito a nivel periférico, y en concreto con hormonas intestinales anorexigénicas, como el CCK, PYY y GLP-1 (Blanco *et al.*, *under review*).

Ciertas hormonas, como el cortisol (Spieler y Noeske, 1984; Chung *et al.*, 2011) y la melatonina (Dijk *et al.*, 1999; Alonso-Gómez *et al.*, 2000; Besseau *et al.*, 2007), y enzimas, como la arilalquilamina N-acetiltransferasa (Coon *et al.*, 1999; Tosini *et al.*, 2006), enzimas de la ruta melatoninérgica (Velarde *et al.*, 2010) y varias de la familia de la citocromo P450 (Zhang *et al.*, 2009), son expresadas y/o secretadas de manera rítmica a lo largo de ciclos de 24 horas. Estos patrones de ritmicidad diaria, gobernados por relojes circadianos endógenos, forman parte de los denominados ritmos de salida del sistema circadiano y tienen como función permitir a los organismos adaptar sus actividades a la mejor hora del día, sincronizando su fisiología y comportamiento para anticiparse a los cambios ambientales diarios (Tsang *et al.*, 2014, Isorna *et al.*, 2017). Centrándonos en el sistema ghrelinérgico, estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito en el carpín ritmos de expresión de *preproghrelina* en el hipotálamo, hipófisis e intestino, así como de *ghs-r1* en las dos localizaciones cerebrales (Sánchez-Bretaña *et al.*, 2015b). En la presente Tesis Doctoral, demostramos que la *goat*, el tercer elemento clave en el sistema ghrelinérgico, también muestra una expresión rítmica en hipotálamo, hipófisis y bulbo intestinal de carpines mantenidos en condiciones ambientales similares (Blanco *et al.*, 2017c). Los patrones de expresión de la *preproghrelina*, del receptor *ghs-r* y de la *goat* son similares en los distintos tejidos analizados, indicando una función coordinada del sistema ghrelinérgico en dichas localizaciones, y reforzando la importancia de la GOAT como enzima encargada de la activación funcional de la ghrelina. El hecho de que la acrofase (momento del ciclo en que ocurre la expresión máxima) del ritmo de expresión de la *goat* en el bulbo intestinal se anticipe 2,5 horas a la acrofase de la *preproghrelina* apoya nuestra hipótesis de una acción de la GOAT sobre otros sustratos distintos a la ghrelina en el tracto gastrointestinal.

Es interesante destacar que la ritmicidad de *goat* es dependiente de tejido, pues se observa en hipotálamo, hipófisis y bulbo intestinal, pero no en telencéfalo y lóbulo vagal. La existencia de perfiles rítmicos en el hipotálamo y el bulbo intestinal, principales centros reguladores involucrados en el control de la ingesta, está en concordancia con el importante rol del sistema ghrelinérgico en la regulación del apetito. Esto se ve reforzado por la similar distribución de la GOAT (Blanco *et al.*, 2016c) y otros reguladores de la ingesta (Kah *et al.*, 1989; Cerdá-Reverter *et al.*, 2000; Kaslin *et al.*, 2004; Panula, 2010) en dichas áreas cerebrales, y por la elevada expresión del receptor ghrelinérgico *ghs-rla* en núcleos hipotalámicos relacionados con la regulación de ingesta (Sánchez-Bretaña *et al.*, 2015b). La expresión rítmica de *goat*, *preproghrelina* y *ghs-r1* en la hipófisis del carpín podría estar relacionada con una posible regulación circadiana de las acciones que el sistema ghrelinérgico ejerce sobre esta glándula, como por ejemplo la estimulación de la liberación de hormonas

(hormona del crecimiento y luteinizante) (Unniappan y Peter, 2004), y en último término, con el posible papel modulador del sistema ghrelinérgico en la reproducción (Shepperd *et al.*, 2012). En la actualidad desconocemos si los efectos de la ghrelina sobre aspectos relacionados con la reproducción en peces son objeto de esta posible regulación circadiana.

Otra observación importante es que los ritmos de expresión de *goat* en animales alimentados durante la fase lumínica del fotociclo no se observan en los peces que recibían alimento durante la fase oscura, indicando que el horario de alimentación es un factor clave para la ritmicidad diaria de la *goat*. La importancia del horario de alimentación como sincronizador de los perfiles de secreción y/o expresión rítmica se ha demostrado previamente para otras hormonas que intervienen en la regulación de la ingesta y el metabolismo, como la leptina, incluso en ausencia de información cíclica de luz/oscuridad (Tinoco *et al.*, 2014b). Cabe señalar que, si bien el horario de alimentación es crucial para que se manifiesten los ritmos de expresión de *goat*, no constituye una señal sincronizadora de la ritmicidad de la expresión de dicha enzima, ya que no se observa un desfase de los ritmos al cambiar la hora de ingesta. Esta función sincronizadora de la alimentación se ha demostrado en cambio para otros genes, como los genes reloj, cuyas acrofases se desplazan en función del horario de alimentación (observaciones de nuestro grupo). Por tanto, en la sincronización de los perfiles rítmicos de expresión de *goat* podrían estar implicadas otras señales externas diferentes al horario de alimentación.

Por último, los resultados de la presente Tesis Doctoral apuntan a que la GOAT es una aciltransferasa regulada por su producto final, ya que su expresión génica y proteica en porciones de intestino mantenidas *in vitro* se reducen significativamente en presencia de altas concentraciones de ghrelina acilada (Blanco *et al.*, 2017c). Esta observación concuerda con la reducción en los niveles de transcritos de *goat* detectada en el cerebro e intestino del pez cebra tras la administración intraperitoneal de ghrelina acilada (Hatef *et al.*, 2015). Este mecanismo de retroinhibición o inhibición por producto, que impide la utilización innecesaria de un sustrato y la acumulación del producto final (o de intermediarios si los hubiera), se ha descrito también para otras aciltransferasas, como la lecitina-retinol aciltransferasa, cuya actividad está regulada por su principal producto, el ácido retinoico (Matsuura y Ross, 1993). Sería necesario investigar si este mecanismo de regulación por producto de la GOAT del carpín también se produce a nivel de la actividad enzimática. En relación a ello, estudios en mamíferos empleando ensayos *in vitro* han demostrado que la actividad de la GOAT de ratón es inhibida por la ghrelina octanoilada (Yang *et al.*, 2008b).

2. LA ALIMENTACIÓN: FACTOR CLAVE EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA GHRELINÉRGICO DEL CARPÍN

La alimentación es uno de los principales reguladores del funcionamiento del sistema ghrelinérgico, en general, y de la síntesis y secreción de ghrelina, en particular. Diversos aspectos relacionados con la misma, como la ingesta individual de una comida (Ariyasu *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2001; Unniappan *et al.*, 2004a; Frecka y Mattes, 2008; Peddu *et al.*, 2009), el patrón de alimentación (Sugino *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2010), la privación de alimento (Unniappan *et al.*, 2004a; González *et al.*, 2008; Kaiya *et al.*, 2010; Eom *et al.*, 2014; Hatef *et al.*, 2015) y la composición de la dieta (Vallejo-Cremades *et al.*, 2004; Jönsson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Alamri *et al.*, 2016), son importantes moduladores del sistema ghrelinérgico. Aunque son numerosos los estudios publicados en relación con estos aspectos, cuestiones relacionadas con la composición de la dieta apenas se han investigado en peces, y los resultados publicados referidos a los efectos del ayuno son muy variados y contradictorios en este grupo de vertebrados. En la presente Tesis Doctoral hemos intentado abordar el estudio de distintos aspectos relacionados con la alimentación sobre los principales componentes del sistema ghrelinérgico del carpín, con la intención de contribuir al esclarecimiento de algunas de las controversias actuales y aportar nueva información relativa a la regulación de la GOAT y los receptores de ghrelina.

Nuestros resultados han mostrado que el carpín muestra cambios periprandiales en los niveles circulantes de ghrelina acilada, pero no de ghrelina desacilada, marcados por un aumento poco antes de la alimentación y una reducción después. El hecho de que únicamente la forma acilada de esta hormona sea la que resulta alterada en respuesta a la alimentación está en concordancia con hipótesis previas indicando que la ghrelina acilada es la única forma de ghrelina con un papel en la regulación de ingesta en vertebrados, tal y como sugiere, por ejemplo, el hecho de que una inyección de ghrelina desacilada en el carpín no afecta a la ingesta de alimentos (Matsuda *et al.*, 2006b). La variación periprandial observada para la ghrelina acilada se corresponde con la de una molécula que actúa como una señal iniciadora de la alimentación. Nuestra propuesta para la ghrelina del carpín coincide con la ampliamente aceptada situación en los mamíferos, que atribuye a esta hormona una función clara iniciando la alimentación cuando los animales tienen acceso restringido a la comida (Ariyasu *et al.*, 2001; Cummings *et al.*, 2001; Frecka y Mattes, 2008; Reynolds *et al.*, 2010). Sin embargo, no concuerda con los estudios previos realizados en peces, en los que la ghrelina circulante no aumenta preprandialmente (carpín, Unniappan *et al.*, 2004a; tilapia, Peddu *et al.*, 2009). Esta aparente discrepancia podría explicarse porque

en dichos estudios se cuantificaron los niveles de ghrelina circulante total, mientras que en esta Tesis hemos analizado los niveles de ghrelina acilada y desacilada de forma separada. La ghrelina circulante, al menos en humanos, se compone de más del 90% de ghrelina desacilada y menos del 10% de ghrelina acilada (Delporte, 2013). Si esta proporción es similar en los peces, la ghrelina desacilada estará enmascarando las posibles variaciones en los niveles de ghrelina acilada, que únicamente podrían ser detectadas cuando las dos formas de hormona se cuantifican de manera separada.

En apoyo de nuestra propuesta de la ghrelina como señal iniciadora de la alimentación en el carpín, aportamos la observación del incremento preprandial en la expresión de *preproghrelina* en el bulbo intestinal, así como de los niveles circulantes de GOAT (probablemente en respuesta a una necesidad de incrementar la acilación ghrelinérgica) (Blanco *et al.*, 2016b). En este punto cabe mencionar que si bien la GOAT es típicamente una proteína localizada en la membrana del retículo endoplásmico, también se ha detectado su presencia en el plasma de ratones (Stengel *et al.*, 2010) y humanos (Goebel-Stengel *et al.*, 2013), lo que sugiere que al menos una fracción de enzima es liberada a la circulación. A la vista de los resultados de la presente Tesis describiendo dos variantes de GOAT en el carpín, y en base a la observación de que una de ellas parece tener un péptido señal y la otra no, podríamos especular que una de estas variantes se podría localizar en el retículo endoplásmico y la otra estaría presente en la sangre, si bien se requieren estudios experimentales que investiguen esta posible hipótesis. En cualquier caso, la existencia de GOAT circulante apunta a una posible acilación de ghrelina extracelular. El incremento periprandial en la expresión de *preproghrelina* en el bulbo intestinal coincide con el incremento de *preproghrelina* en el estómago de la tilapia 1 hora antes de la comida (Peddu *et al.*, 2009), pero no con los resultados obtenidos en estudios previos en el tracto gastrointestinal del carpín (Unniappan *et al.*, 2004a) y el pez cebra (Hatef *et al.*, 2015). Considerando que el estómago (o su equivalente en especies carentes de él) es la principal fuente de ghrelina, parece ser que las variaciones periprandiales en la expresión ghrelinérgica se limitan a dicha región del tracto, por lo que sólo se detectan cuando se analiza cada región de manera separada. Asimismo, el hecho de que la expresión génica del receptor GHS-R1a1 muestre un perfil periprandial similar al de *preproghrelina* en el bulbo intestinal del carpín apoya las acciones preprandiales locales de la ghrelina, así como sugiere una implicación particular de este subtipo de receptor en tales funciones.

Ahora bien, ¿cuál es la respuesta del sistema ghrelinérgico cuando se priva a los peces de alimento durante una semana o periodos más largos? A la vista de los resultados obtenidos, parece que la privación de alimento en el carpín, independientemente de su duración, no

afecta a la secreción de ghrelina (acilada y desacilada) ni de GOAT. Los estudios previos publicados en peces describen incrementos en los niveles plasmáticos de ghrelina en respuesta a periodos muy cortos de privación de alimento (24 horas en la trucha arco iris, Pankhurst *et al.*, 2008; 48 horas en el salmón Atlántico, Hevrøy *et al.*, 2011; y 72 horas en el carpín, Unniappan *et al.*, 2004a), pero no encuentran variaciones en ayunos más largos (Unniappan *et al.*, 2004a; Riley *et al.*, 2008; Fox *et al.*, 2009; Hevrøy *et al.*, 2011). Nuestros resultados de ayuno de 7 y 30 días concuerdan con estas observaciones en relación con la falta de efecto a nivel circulante. No obstante, muestran que la privación de alimento es capaz de producir importantes variaciones en la expresión génica de los diferentes componentes del sistema ghrelinérgico en varios tejidos. Las variaciones más importantes de expresión génica se han observado en el bulbo intestinal, donde la cantidad de transcritos de *preproghrelina* ha incrementado considerablemente en respuesta a ayunos de 7 y 30 días, como cabe esperar para una hormona estimuladora del apetito. La inducción de la expresión del precursor de ghrelina por el ayuno es un efecto bien conservado en la evolución, desde los peces (Unniappan *et al.*, 2004a; Matsuda *et al.*, 2006c; Terova *et al.*, 2008, Amole y Unniappan, 2009; Feng *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014a) hasta los mamíferos (González *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008).

En relación al resto de componentes del sistema ghrelinérgico, describimos que la falta de alimento modula significativamente la expresión de *goat* y *ghs-rla2* en el bulbo intestinal. Los estudios publicados referentes a los efectos del ayuno sobre la GOAT son muy escasos y muestran cierta controversia, particularmente en los mamíferos, en los que ayunos de 1 día (Gahete *et al.*, 2010) y 21 días (González *et al.*, 2008) incrementan la expresión de *goat* en ratón y rata (respectivamente), pero el efecto contrario también se ha publicado con ayunos de 12, 24 y 36 horas en ratón (Kirchner *et al.*, 2009). El reducido número de estudios publicados y las potenciales dianas de regulación de la GOAT (transcripcional, traduccional, niveles de actividad enzimática, disponibilidad de sustrato) dificultan la obtención de conclusiones en este sentido, y motivan a realizar estudios adicionales para dilucidar las aparentes discrepancias. En los peces, el único estudio disponible hasta el momento muestra un aumento de la expresión de *goat* en el intestino de peces cebras en respuesta a periodos de ayuno de 3 y 7 días (Hatef *et al.*, 2015), en concordancia con nuestras observaciones. Los resultados obtenidos en relación con los cambios en la expresión de los receptores ghrelinérgicos en el bulbo intestinal al exponer a los carpines a condiciones de ayuno difieren con la falta de efecto de un ayuno de 7 días sobre la expresión intestinal de *ghs-rla1* y *ghs-rla2* en el carpín descrita por Kaiya y colaboradores (2010), discrepancias que podrían encontrar su explicación en las grandes diferencias de peso (y con ello de estado reproductor)

de los peces usados en ambos estudios (3-10 g *versus* 20-30 g). Las observaciones de esta Tesis nos permiten sugerir que, mientras que el receptor ghrelinérgico del subtipo GHS-R1a1 parece mediar la acción periprandial de la ghrelina a nivel intestinal, el subtipo GHS-R1a2 estaría implicado en situaciones de falta de alimento (Blanco *et al.*, 2016b). La presente es la primera descripción de una posible implicación diferencial de los distintos receptores ghrelinérgicos en las respuestas del sistema a diferentes aspectos relacionados con la alimentación.

Además del bulbo intestinal, ciertos tejidos centrales parecen jugar un papel clave en las respuestas del sistema ghrelinérgico a la privación de alimento. Tal es el caso principalmente del telencéfalo, en donde el ayuno de 24 h, 7 días y 30 días ha producido importantes variaciones en la expresión de todos los componentes del sistema (Blanco *et al.*, 2016b). Estas observaciones apuntan a que dicha área cerebral es un regulador clave de las respuestas a la alimentación en el cerebro del carpín, que estaría implicada no sólo en la expresión de ghrelina sino también en su tasa de activación funcional y en sus mecanismos de acción. Junto al telencéfalo podríamos citar al lóbulo vagal, área que estaría implicada en las respuestas del sistema ghrelinérgico al ayuno en forma, al menos, de una modulación de la expresión de sus receptores, como sugieren los incrementos en la expresión de los mismos como consecuencia de la privación de alimento (Blanco *et al.*, 2016b). Los resultados presentados sugieren además una modulación diferencial de los distintos subtipos de receptores en el lóbulo vagal del carpín en función de la duración del ayuno: los cuatro subtipos estarían implicados en periodos de ayuno de muy corta duración (24 h), mientras que los GHS-R de tipo 2, pero no de tipo 1, intervendrían cuando la duración del ayuno es mayor. La falta de efecto de un ayuno de 7 días sobre la expresión de los GHS-R de tipo 1 no concuerda con observaciones previas de un incremento en la expresión de ghs-rla1 en el lóbulo vagal (Kaiya *et al.*, 2010), lo cual, como se indicó anteriormente, puede deberse al diferente peso de los animales empleados.

Es interesante resaltar que ni la omisión de una comida diaria ni la privación de alimento durante periodos más largos han modificado de una manera notable la expresión de los diferentes componentes del sistema ghrelinérgico en el hipotálamo. Únicamente la expresión de *goat* se ha visto significativamente incrementada en este tejido como consecuencia de un ayuno de 30 días de duración. Estos resultados podrían parecer *a priori* sorprendentes dada la importancia del hipotálamo en los mecanismos de regulación de la ingesta y del control de sensaciones de hambre y saciedad, al menos en mamíferos (Smith y Ferguson, 2008). Sin embargo, los resultados de la presente Tesis Doctoral apuntan a que en peces, o al menos en el carpín, esta área cerebral no estaría involucrada de manera directa en

las respuestas del sistema ghrelinérgico a la privación de alimento, sino que esta función estaría siendo cumplida por otras áreas cerebrales, como el telencéfalo y/o el lóbulo vagal. Estas áreas parecerían ser las encargadas de detectar situaciones de falta de alimento y responder con variaciones en la expresión de los diferentes componentes del sistema ghrelinérgico.

Otro aspecto de la alimentación que hemos estudiado es si la composición de la dieta modifica la expresión génica de los diferentes componentes del sistema ghrelinérgico, pudiendo de esta manera llegar a alterar eventualmente el mecanismo de acción de la ghrelina en algunas de sus funciones fisiológicas. Esta cuestión apenas se ha investigado hasta la fecha en los peces, excepto en un único estudio realizado en la trucha arco iris que revela que la alimentación con una dieta rica en lípidos parece conducir a un aumento en los niveles circulantes de ghrelina (Jönsson *et al.*, 2007). En la presente Tesis Doctoral mostramos resultados sobre efectos a corto y largo plazo de la ingesta de dietas enriquecidas en los diferentes macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) sobre la expresión de *preproghrelina*, *ghat* y *ghs-rl* en tejidos centrales y periféricos del carpín. Es importante destacar que las diferentes dietas no alteraron significativamente el peso corporal de los peces, aunque observamos una modulación diferencial del sistema ghrelinérgico en estos animales.

La dieta rica en lípidos es la que ha modificado de forma más evidente la expresión del sistema ghrelinérgico en el carpín, particularmente en la hipófisis, donde la expresión de *preproghrelina*, *ghat* y *ghs-rl* aumenta significativamente al alimentar los peces tanto a corto como a largo plazo con una dieta enriquecida en estos compuestos. A la vista de estos resultados, sugerimos que el sistema ghrelinérgico local en la hipófisis podría actuar como mediador de las acciones de una dieta rica en lípidos en algunos ejes neuroendocrinos del organismo, como el eje de crecimiento o el reproductor (Kim *et al.*, 2012; Nzohabonayo *et al.*, 2017). Además, la hipófisis está implicada en el control neuroendocrino de numerosas funciones, como por ejemplo las respuestas al estrés. Determinadas situaciones de estrés en los mamíferos, que cursan con altos niveles de cortisol circulantes, estimulan la ingesta de alimento, lo cual, entre otras cosas, activa los circuitos cerebrales de recompensa (Adam y Epel, 2007). En los últimos años, se ha relacionado al sistema ghrelinérgico con los sistemas de recompensa en los mamíferos, en base a varios estudios que han sugerido que la ghrelina, además de su prominente papel en la ingesta homeostática, parece ser un potente modulador de las recompensas mesolímbicas obtenidas tras la alimentación. Así, la administración central y periférica de ghrelina conduce a un incremento de la motivación incentivada por la sacarosa en la rata (Skibicka *et al.*, 2012a), mientras que los ratones *knockout* para el gen de

GHS-R1a y las ratas tratadas con un antagonista de dicho receptor muestran una supresión de la ingesta de alimentos gratificantes frente a la ingesta de alimento habitual (Egecioglu *et al.*, 2010). Además, de forma particular, los triglicéridos de la dieta actúan de manera directa sobre los circuitos de recompensa mesolímbica en los roedores, regulando los aspectos gratificantes y motivacionales de la ingesta (Cansell *et al.*, 2014). A la vista de estos antecedentes, y a pesar del alto grado de desconocimiento del sistema de recompensa en los peces, cabría plantearse si la activación del sistema ghrelinérgico pudiera estar actuando como uno de los mecanismos por los que una dieta rica en lípidos incrementa la ingesta y activa sistemas de recompensa cerebrales. En apoyo de esta hipótesis se encuentra la presencia de transcritos del receptor *ghs-rla* en la porción central del telencéfalo dorsal de peces (Sánchez-Bretaña *et al.*, 2015b), en las que se ha descrito la presencia de tirosina hidroxilasa (enzima implicada en síntesis de dopamina) (Adrio *et al.*, 2002). El conocimiento de estos sistemas en los peces es muy limitado, pero se trata de un área de investigación emergente que puede proporcionar información importante en relación con el control del comportamiento alimentario.

A nivel periférico, una alta proporción de lípidos en la dieta condujo a una sobreexpresión del receptor *ghs-rl* en el intestino y el hígado a medio y largo plazo (7 y 28 días, respectivamente). Algunos de los ácidos grasos ingeridos en la dieta son directamente utilizados por la GOAT para la acilación y consecuente activación de la ghrelina (Nishi *et al.*, 2005; Kaiya *et al.*, 2013a), lo que puede inducir a pensar que una ingesta abundante en lípidos potencialmente podría aumentar los niveles de ghrelina acilada, con la consiguiente demanda de un mayor número de receptores disponibles. Una de las posibles implicaciones fisiológicas de este hipotético incremento en los niveles de ghrelina acilada, y del observado aumento de la expresión de *ghs-rl* en el intestino y el hígado ante la presencia de elevados niveles de lípidos en el cuerpo, podría ser la inducción en la expresión de lipoproteína lipasa que provoca la ghrelina en estos dos tejidos (Blanco *et al.*, 2017b), acción que facilitaría la digestión de las grasas ingeridas. En los mamíferos, una dieta rica en grasas induce la expresión de *ghs-rla* en el ganglio nodoso (Paulino *et al.*, 2009), principal vía de transmisión aferente desde el tracto gastrointestinal al cerebro. Según exponen los autores, este aumento en la expresión de *ghs-rla* resultaría en una estimulación de la señal orexigénica y un incremento de la ingesta. A día de hoy desconocemos si este circuito ocurre también en el carpín, pero aunque en el estudio realizado en la presente Tesis no se ha cuantificado la ingesta, se observó que los peces alimentados con dietas ricas en lípidos mostraban una mayor excitación ante el alimento y lo ingerían con mayor rapidez que los que recibían dietas ricas en proteínas o hidratos de carbono. Esta excitación podría estar relacionada con

la recompensa esperada y el incremento en los niveles de expresión del sistema ghrelinérgico en el telencéfalo, como se ha mencionado anteriormente.

En cuanto a los hidratos de carbono, la ingesta a largo plazo de dietas ricas en estos compuestos incrementó la expresión de todos los componentes del sistema ghrelinérgico en la hipófisis, y de *goat* y del receptor *ghs-r1* en el intestino del carpín. Estos resultados concuerdan con el hallazgo en esta Tesis de la acción estimuladora que la glucosa ejerce en la secreción de ghrelina y en la expresión génica intestinal de *preproghrelina*, *goat* y *ghs-r1* (Blanco *et al.*, 2017a), y apoyan la posible participación del sistema ghrelinérgico hipofisario como mediador de las acciones de los hidratos de carbono de la dieta en el crecimiento y/o aspectos reproductores del carpín. De forma similar a lo tratado para los lípidos, en esta Tesis se ha descrito un potente papel estimulador por la ghrelina de la expresión intestinal de enzimas relacionadas con la digestión de glúcidos, como la sacarasa-isomaltasa (Blanco *et al.*, 2017b), por lo que de nuevo podemos hipotetizar que, en el carpín, la ingesta de una dieta rica en estos macronutrientes ejercería una activación del sistema ghrelinérgico a nivel intestinal con el fin de facilitar su digestión. El efecto estimulador de los carbohidratos sobre el sistema ghrelinérgico concuerda con estudios en mamíferos, donde los niveles plasmáticos de ghrelina aumentan en ratas alimentadas con dietas ricas en hidratos de carbono en comparación con ratas alimentadas con dietas balanceadas (Beck *et al.*, 2002). Los estudios incluidos en la presente Tesis constituyen la primera evidencia acerca de un papel modulador de los hidratos de carbono sobre el sistema ghrelinérgico de los peces.

A diferencia de lo encontrado para lípidos e hidratos de carbono, las proteínas no parecen desempeñar un papel relevante en la modulación de la expresión del sistema ghrelinérgico del carpín. Únicamente hemos observado un efecto transitorio de disminución en la expresión de *preproghrelina* y *ghs-r1* en el hígado tras la ingesta de una dieta rica en proteínas. Además, cuando investigamos los efectos de la ghrelina en la tripsina hepática encontramos un efecto inhibitorio sobre la expresión de esta enzima, al contrario de lo que ocurría con las carbohidrolasas y lipasas. Por tanto, aparentemente el sistema podría funcionar de manera inversa para las proteínas que para los otros dos macronutrientes, es decir, los niveles elevados de proteínas como consecuencia de una ingesta rica en las mismas inhibirían el sistema ghrelinérgico a nivel hepático para atenuar el efecto inhibitorio de la ghrelina sobre proteasas, favoreciendo de este modo la digestión de las grandes cantidades de proteínas ingeridas. No obstante, llama nuestra atención que una sobrecarga de proteínas en la dieta no modifique el sistema ghrelinérgico a nivel intestinal, pues la ghrelina ejerce un potente efecto estimulador de la expresión de *aminopeptidasa A* en este tejido (Blanco *et al.*, 2017b). Una posible explicación a esta aparente paradoja es que algunos de los efectos de los

macronutrientes, en este caso de las proteínas, no se ejerzan a nivel transcripcional (como hemos investigado), sino a nivel post-transcripcional, cuestión no analizada en nuestro estudio.

En línea con hipótesis previas planteadas en esta Discusión, merece mencionarse que ninguna de las dietas enriquecidas en macronutrientes ha modificado la expresión del sistema ghrelinérgico en el hipotálamo del carpín. Este resultado, junto con las demás observaciones presentadas en esta Tesis relativas al hipotálamo, puede interpretarse en el sentido de que el sistema ghrelinérgico hipotalámico de este teleósteo no parece intervenir en las respuestas del organismo a la ingesta diaria de alimentos, la exposición a situaciones de ayuno o a cambios en la dieta, a diferencia de lo encontrado para otros neuropéptidos, como el NPY (Narnaware y Peter, 2002). En relación a esta idea, los resultados de la presente Tesis nos conducen a postular que el sistema ghrelinérgico hipotalámico del carpín no estaría cumpliendo funciones relacionadas con la alimentación sino que estaría involucrado en otras funciones que a día de hoy desconocemos. Serían, en cambio, la ghrelina de origen intestinal o de origen central extrahipotalámico (telencefálica y/o del lóbulo vagal) las que mediarían las respuestas del sistema ghrelinérgico a la ingesta y la privación de alimento. No obstante, no podemos descartar que otros factores puedan justificar la falta de respuesta a nivel del hipotálamo, por lo que sería necesario realizar experimentación adicional para descartar la implicación de la ghrelina hipotalámica en la alimentación.

3. EL SISTEMA GHRELINÉRGICO Y SU IMPLICACIÓN EN FUNCIONES DIGESTIVAS DE LOS TELEÓSTEOS

Entre la gran variedad de acciones en las que interviene el sistema ghrelinérgico, su papel en la regulación de la ingesta y el balance energético son, junto a su acción moduladora de la liberación de hormona de crecimiento, las más conocidas y destacadas. A pesar de ello, la complejidad del sistema ghrelinérgico hace que muchos aspectos relacionados con estas funciones permanezcan aún desconocidos, especialmente en peces. Los resultados presentados en el capítulo 3 y 4 de la presente Tesis Doctoral profundizan en los conocimientos que a día de hoy disponemos acerca del papel de la ghrelina como señal estimuladora de apetito en los peces y aportan importantes evidencias sobre funciones novedosas que esta hormona podría estar desempeñando en relación al balance energético en estos vertebrados.

La acción orexigénica de la ghrelina se atribuyó a esta hormona al poco tiempo de su

descubrimiento, tanto en los mamíferos (Kamegai *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000) como en los peces (Unniappan *et al.*, 20002). En estos últimos, esta acción está mediada por, al menos, dos potentes orexigénicos, el NPY y la orexina, cuya expresión hipotalámica es estimulada por ghrelina (Miura *et al.*, 2006; 2007). Estudios posteriores han demostrado que la ghrelina no sólo actúa en el cerebro para estimular sustancias orexigénicas sino que también inhibe la expresión de anorexígenos, como la nesfatina-1 hipotalámica (Kerbel y Unniappan, 2012). En la presente Tesis Doctoral, la obtención de peces *knockdown* para ghrelina nos permite contrastar esta interacción entre reguladores del apetito a nivel central, encontrando que cuando la expresión de ghrelina se encuentra disminuida, existe un aumento en la expresión cerebral de *agrp* y una disminución en la expresión de *pomc* y *cart*. Esta observación parece indicar que los mecanismos centrales encargados de la regulación de la ingesta son capaces de compensar el déficit de una señal orexigénica como la ghrelina con la sobreexpresión de otras señales orexigénicas como el AgRP y la reducción de señales anorexigénicas como POMC y CART. Cabe destacar que los organismos deficientes de ghrelina empleados en la presente Tesis pertenecen a la generación F₀, lo que implica que probablemente la mutación que presentan se encuentre únicamente en uno de los dos alelos del gen. Esto puede determinar que los resultados obtenidos, especialmente en términos de magnitud de los incrementos/descensos, no reflejen con total exactitud las respuestas totales del organismo ante la falta de esta hormona, si bien ofrecen un panorama general inicial de valioso interés para el estudio de las implicaciones del sistema ghrelinérgico.

Teniendo en cuenta que la ghrelina es una hormona de origen principalmente periférico, cabe preguntarse si en su acción orexigénica, además de estar implicados reguladores centrales, intervienen reguladores periféricos del apetito. En la presente Tesis Doctoral, para abordar esta cuestión se han utilizado aproximaciones *in vivo* e *in vitro*, por su complementariedad. La realización de aproximaciones *in vitro* tiene la ventaja de permitir el estudio de efectos directos de una hormona sobre una diana determinada, mientras que los estudios *in vivo* aportan información de las respuestas en el organismo completo. Los diseños experimentales *in vitro* realizados en la presente Tesis revelan una interacción de la ghrelina con otros reguladores entéricos, en concreto al menos con la CCK, el PYY y el GLP-1, a nivel intestinal (Blanco *et al.*, *under review*), y sugieren la posibilidad de que la ghrelina ejerza efectos endocrinos, paracrinós o incluso autocrinos sobre estos reguladores entéricos en la modulación de la ingesta. La expresión disminuida de *prepro-cck*, el *prepro-pyy* y el *proglucagón* en el intestino de los peces cebra deficientes de ghrelina apoyan esta interacción. En conjunto, estos resultados apuntan a una implicación de ambos reguladores, centrales y periféricos, en la acción orexigénica de la ghrelina. Asimismo, el estudio de las interacciones

in vivo entre la ghrelina y la CCK, el PYY y el GLP-1 en la regulación de la ingesta de alimentos ha demostrado que la ghrelina interactúa con estos tres anorexígenos ejerciendo efectos aditivos sobre la ingesta de alimento. Esta observación no parece *a priori* aportar información adicional a lo que cabe esperar que ocurra ante la presencia de compuestos con efectos contrarios sobre una misma función, pero informa acerca la potencia relativa de los diferentes reguladores del apetito, lo que podría resultar de interés, por ejemplo, a la hora de buscar mejorar las estrategias de alimentación de las especies en acuicultura. Nuestros resultados apuntan a que las potencias orexigénica/anorexigénica de la ghrelina, la CCK y el GLP-1 en el carpín parecen ser similares, pues la administración conjunta de ghrelina y uno de estos inhibidores del apetito contrarresta sus acciones, sin observarse cambios significativos de la ingesta. Sin embargo, el hecho de que la coadministración de ghrelina y PYY haya resultado en una inhibición del apetito sugiere que el PYY posee una potencia anorexigénica mayor que la potencia orexigénica de la ghrelina. Hasta la fecha no se han realizado estudios similares en los peces, pero resultados previos en los mamíferos describiendo los efectos de las administraciones combinadas de ghrelina y CCK (Date *et al.*, 2005; Kobelt *et al.*, 2005), PYY (Chelikani *et al.*, 2006) y GLP-1 (Chelikani *et al.*, 2006; Schusdziarra *et al.*, 2008) corroboran nuestros resultados en los peces.

En los mamíferos, se ha sugerido que el efecto de la coadministración de un orexígeno y un anorexígeno en la ingesta de alimentos podría implicar cambios en las señales aferentes de saciedad/hambre desde el intestino al cerebro. Así, se ha planteado la hipótesis de que el efecto de la administración combinada de ghrelina y CCK en la ingesta de alimentos se encuentra mediado por mecanismos hipotalámicos que implican principalmente al ARC. Esta posibilidad se basa en la modificación de la actividad neuronal observada en dicho núcleo cuando se administra periféricamente ghrelina y CCK de forma conjunta (Kobelt *et al.*, 2005), y en la disminución en la activación neuronal en el ARC en respuesta a la ghrelina por la pre- o co-administración de CCK (Date *et al.*, 2005). De forma similar, la administración subcutánea de PYY inhibe directamente a las neuronas activadas por ghrelina del ARC de rata (Riediger *et al.*, 2004). Además, se describió que la actividad del nervio vago gástrico aferente se encuentra suprimida por ghrelina y potenciada por CCK en ratas (Date *et al.*, 2002). En los peces, los centros cerebrales, mecanismos y las vías que están mediando este tipo de interacciones entre reguladores del apetito son de momento desconocidos y constituyen aspectos cuyo estudio sería de gran interés y merece una consideración futura.

Una cuestión adicional de interés es averiguar si, además de favorecer la ingestión de mayores cantidades de alimento, la ghrelina ayuda a la digestión de los alimentos ingeridos y

la posterior absorción de los nutrientes. En los peces, esta funcionalidad de la ghrelina en procesos digestivos apenas se ha investigado, habiéndose descrito únicamente acciones reguladoras de la motilidad intestinal, si bien los resultados son contradictorios en distintas especies (Olsson *et al.*, 2008; Kitazawa *et al.*, 2012). Los resultados presentados en la presente Memoria describen por primera vez en los peces un papel de la ghrelina modulando la expresión de diferentes enzimas digestivas (sacarasa-isomaltasa, aminopeptidasa A, tripsina y lipoproteína lipasa; Hidalgo *et al.*, 1999) tanto en el intestino como en el hígado del carpín *in vitro*. Hay que tener presente que la anatomía difusa del hígado del carpín imposibilita separar el tejido pancreático de las poblaciones de hepatocitos, por lo que nuestros cultivos contienen una mezcla de ambas poblaciones celulares. La existencia de una acción estimuladora de la ghrelina sobre la expresión de enzimas digestivas en peces se ve reforzada por el hecho de que la expresión génica intestinal de *sacarasa-isomaltasa* y *aminopeptidasa A* y hepática-pancreática de *sacarasa-isomaltasa* y *tripsina* se encuentra significativamente disminuida en peces cebra *knockdown* para ghrelina (capítulo 4 de la presente Tesis Doctoral). El hecho de encontrar una modulación en la expresión génica y proteica de enzimas digestivas, aunque sea esperable, no nos permite concluir que la actividad enzimática también sea modulada en la misma dirección, para lo cual sería necesario realizar estudios de actividad enzimática. No obstante, los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren que la ghrelina estaría contribuyendo a la digestión de alimentos en los peces, de manera similar a lo descrito en mamíferos, en los que la ghrelina participa en la regulación de funciones gástricas y procesos digestivos a través de la estimulación de la secreción gástrica (Masuda *et al.*, 2000; Date *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2007; Yakabi *et al.*, 2008), la modulación de la expresión y actividad de la pepsina en el estómago y duodeno (Warzecha *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2016) y la regulación de la secreción de enzimas pancreáticas (Sato *et al.*, 2003; Nawrot-Porabka *et al.*, 2007; Kapica *et al.*, 2008).

El análisis detallado de la evolución temporal y la magnitud de los efectos de la ghrelina sobre cada una de las enzimas digestivas en los dos tejidos estudiados muestra que la regulación ghrelinérgica de la expresión de sacarasa-isomaltasa y aminopeptidasa A es claramente más marcada en el intestino que en el hígado, sugiriendo una implicación principal del intestino en la modulación ghrelinérgica de carbohidrasas y peptidasas. Además, las acciones de la ghrelina sobre las células intestinales son más rápidas y de mayor duración que en las células del hígado-páncreas, lo que indica que las primeras son más sensibles a la modulación ghrelinérgica y responden de manera más prolongada. Respecto a los lípidos, el intestino y el hígado-páncreas parecen tener una implicación similar en las respuestas observadas, si bien nuestros resultados apuntan a que la modulación ghrelinérgica

de enzimas implicadas en la digestión de estos macronutrientes es secundaria respecto a la modulación de enzimas digestivas de carbohidratos y proteínas. Si bien la aproximación experimental realizada es *in vitro* y se requerirían ensayos *in vivo* para averiguar la implicación de la inducción ghrelinérgica de la expresión de enzimas digestivas en la fisiología digestiva de los peces, los resultados presentados proponen por primera vez a la ghrelina como modulador de procesos digestivos de los teleósteos, que podría tener lugar de forma complementaria a las acciones ejercidas por otros péptidos entéricos clásicamente relacionados con esta función en peces, como la colecistocinina (Rojas-García y Rønnestad, 2002; Holmgren y Olsson, 2009) y la secretina (Nelson y Sheridan, 2006).

En relación a la absorción de nutrientes, prácticamente se desconoce si la ghrelina puede intervenir de un modo directo en este proceso. En la bibliografía consultada, el único estudio realizado al respecto, utilizando ratones deficientes del gen *ghs-r*, apunta a una acción estimuladora de la ghrelina sobre la absorción intestinal de triglicéridos (Longo *et al.*, 2008), no existiendo evidencias disponibles acerca de una función de esta hormona sobre la absorción de otros nutrientes, como hidratos de carbono o proteínas, en ningún grupo animal. Entre los objetivos perseguidos en la presente Tesis Doctoral, hemos buscado dilucidar si la ghrelina cumple un papel en la absorción intestinal de glucosa en los teleósteos. Hemos elegido a este monosacárido como modelo debido a que la ghrelina ha sido previamente implicada en la homeostasis de sus niveles tanto en mamíferos (Delhanty y van der Lely, 2011; Dezaki, 2013) como en peces (Cruz *et al.*, 2010; Polakof *et al.*, 2011), así como en mecanismos glucosensores de ambos grupos de vertebrados (mamíferos: Wang *et al.*, 2008; peces: Polakof *et al.*, 2011). Además, se ha observado que la ghrelina modula la captación de glucosa en distintos tipos celulares de rata, como astrocitos primarios del hipotálamo (Fuente-Martín *et al.*, 2016), adipocitos (Patel *et al.*, 2006) y miocitos (Cao *et al.*, 2011).

Pero, ¿afecta la ghrelina al transporte de glucosa en las membranas de las células intestinales, modulando de esta manera la absorción de este nutriente? Nuestros resultados demuestran que la ghrelina estimula (tanto *in vivo* como *in vitro*) la expresión génica y proteica de los tres principales transportadores de glucosa localizados en el intestino: GLUT2 y los cotransportadores sodio/glucosa de tipo 1 y 2 (SGLT1 y SGLT2) (Blanco *et al.*, 2017a), observación que concuerda con el descenso significativo de la expresión génica de *glut2* y *splt1* en el intestino de peces cebra mutantes con deficiencia de ghrelina. Entre los diferentes transportadores estudiados, SGLT1 parece ser el más sensible a ghrelina, puesto que la reducción de su expresión en los peces cebra mutantes es más marcada que la de *glut2*, y su expresión en el intestino de carpines fue la más alterada en los estudios *in vivo* e *in vitro* con ghrelina. Además, la expresión de *splt1* fue la única que resultó modificada a todos los

tiempos post-inyección/post-incubación estudiados, mientras que la expresión del resto de transportadores únicamente varió a tiempos más largos (120 minutos). Esto último podría indicar una cronología en las acciones de la ghrelina sobre los diferentes transportadores de glucosa, lo cual podría estar de acuerdo con facilitar primero la absorción de glucosa desde lumen intestinal hacia el interior de las células intestinales (transporte mediado principalmente por SGLT1, al menos en mamíferos; Röder *et al.*, 2014) y asistir luego en su transporte desde el citosol a la sangre (mediado en mamíferos fundamentalmente por GLUT2; Mueckler, 1994; Röder *et al.*, 2014). Un estudio en peces empleando enterocitos aislados de pez gato sugiere que un mecanismo equivalente gobierna el transporte intestinal de glucosa en estos vertebrados (Soengas y Moon, 1998). Las observaciones obtenidas en el presente trabajo describiendo la presencia de SGLT1 en el borde en cepillo de las células de la mucosa intestinal y de GLUT2 en el borde basolateral, coincidentes con la descripción previa de ambos transportadores en el intestino de la trucha arco iris (Polakof *et al.*, 2010), apoyan este modelo tradicional de transportadores implicados en la absorción de glucosa intestinal. Sin embargo, no sólo GLUT2 sino también SGLT1 y SGLT2 fueron detectados en la membrana basolateral de las células de la mucosa del carpín (Blanco *et al.*, 2017a), lo que sugiere que los tres transportadores participarían en el transporte de glucosa desde el citosol a la sangre en este teleosteo. Nuestros resultados han demostrado, además, que la ghrelina incrementa la translocación de GLUT2 desde el interior de las células intestinales hacia la membrana plasmática. La translocación de este tipo de transportador ha sido descrita previamente en rata como un mecanismo que permite la absorción de grandes cantidades de glucosa por difusión facilitada ante la presencia de niveles muy elevados de este azúcar en el lumen intestinal (Chaudhry *et al.*, 2012; Röder *et al.*, 2014). La observación de que la ghrelina promueve esta rápida inserción de GLUT2 en la superficie de las células intestinales del carpín sugiere que la hormona favorece la capacidad de estas células para captar glucosa.

Sin embargo, mientras que los resultados *in vitro* indican que la ghrelina parece aumentar la absorción intestinal de glucosa, el tratamiento *in vivo* con esta hormona conduce a una disminución de los niveles de este monosacárido en la sangre. Esta observación no concuerda con observaciones previas en otras especies de peces, como la tilapia, donde se ha detectado un incremento en la glucemia tras la administración de ghrelina (Schwandt *et al.*, 2010), o la trucha arco iris, donde la glucemia no se ve alterada por la administración de ghrelina (Polakof *et al.*, 2011), resultados que apuntan a que los efectos de la ghrelina sobre los mecanismos encargados de la glucemia son dependientes de la especie. Los resultados obtenidos en el carpín podrían deberse a que la ghrelina *in vivo* pueda estar ejerciendo efectos estimulantes sobre transportadores de glucosa localizados no sólo en

el intestino (favoreciendo así su absorción hacia la sangre) sino también en tejidos de almacenamiento, como por ejemplo el hígado, lo cual promovería la entrada de glucosa a dichos tejidos, y la eventual disminución de la glucosa circulante. A favor de esta hipótesis hemos encontrado que la expresión de *glut2* y *sgl1* en el hígado del carpín incrementa por el tratamiento *in vitro* con ghrelina, y que los niveles génicos de ambos transportadores son significativamente menores en el hígado de peces cebra mutantes deficientes de ghrelina. De esta manera, la ghrelina facilitaría la captación de glucosa desde la sangre al interior de las células hepáticas, contribuyendo a evitar una situación de hiperglucemia y promoviendo el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, situación habitual en el carpín y otras carpas dada su condición de especies tolerantes a la hipoxia (Vornanen *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en esta Tesis sugieren la existencia de una regulación bidireccional entre la ghrelina y la glucosa en el carpín, puesto que hemos observado que la glucosa es también un importante modulador de la expresión y secreción de ghrelina (Blanco *et al.*, 2017a). Esta posible hipótesis se pone de manifiesto por la presencia de células intestinales coexpresando ghrelina y los transportadores GLUT2 y SGLT2. Los transportadores de glucosa se localizan principalmente en enterocitos; sin embargo, la presencia de alguno de ellos, especialmente de SGLT1, fue observada en células enteroendocrinas tanto de mamíferos (Harada e Inagaki, 2012; Moran-Ramos *et al.*, 2012) como de peces (Polakof *et al.*, 2010, Polakof y Soengas, 2013). Se ha sugerido que este transportador, junto con los receptores de sabor TAS2R y otros receptores acoplados a proteína G, están presentes en algunas células enteroendocrinas como parte de la maquinaria que interactúa con componentes químicos de los alimentos para activar la liberación de péptidos intestinales, tales como CCK, PYY, GIP y GLP-1 (Harada e Inagaki, 2012; Moran-Ramos *et al.*, 2012; Avau *et al.*, 2015). Además, se ha descrito que la secreción de GIP y GLP-1 se estimula por la ingestión de grasa, tanto en ratones de tipo salvaje como deficientes en SGLT1, pero no por la de glucosa en ratones deficientes en SGLT1, lo que demuestra claramente que este transportador juega un papel crítico en la secreción de incretinas en respuesta a la glucosa *in vivo* (Gorboulev *et al.*, 2012). Los resultados de esta Tesis demuestran que un aumento de la glucosa circulante desempeña un importante papel estimulante sobre el sistema ghrelinérgico del carpín, puesto que la administración de glucosa incrementa la secreción de ghrelina y la expresión génica de *preproghrelina*, *goat* y *ghs-rl* intestinal, en concordancia con observaciones previas en tilapia (Riley *et al.*, 2009). Sin embargo, el hecho de que GLUT2 y SGLT2, pero no SGLT1, se coexpresen con ghrelina en las mismas células sugiere un papel para GLUT2 y/o SGLT2, pero no para SGLT1, en la liberación de ghrelina por las células endocrinas intestinales del carpín.

Como último paso en el estudio de las funciones del sistema ghrelinérgico sobre la regulación de la ingesta y el balance energético de los peces teleósteos, los estudios de la presente Tesis han investigado el mecanismo de acción y las cascadas de señalización intracelular que la ghrelina estaría empleando para ejercer las funciones observadas. En el carpín se han identificado cuatro subtipos de receptores de ghrelina acoplados a proteínas G (Kaiya *et al.*, 2010), de los cuales únicamente los receptores de tipo 1 (GHS-R1a1 y GHS-R1a2) se expresan en el intestino y el hígado (Kaiya *et al.*, 2010), por lo que solamente estos dos subtipos de receptores podrían estar mediando las acciones que hemos descrito para la ghrelina en relación con la modulación de la expresión de otros reguladores del apetito a nivel intestinal, la expresión intestinal y hepática de enzimas digestivas y la expresión intestinal de transportadores de glucosa. Mediante el uso de un antagonista específico de los receptores del subtipo GHS-R1a ([D-Lys3]-GHRP-6), hemos comprobado que, como cabría esperar teniendo en cuenta su distribución, estos receptores están mediando todas las acciones de ghrelina observadas, puesto que en todos los experimentos llevados a cabo el pretratamiento de los fragmentos intestinales o hepáticos con el mencionado antagonista previo a la adición de ghrelina bloquea la aparición de los efectos ejercidos por esta hormona. Cabe destacar que el antagonista utilizado no distingue entre los dos subtipos de receptores de tipo 1a del carpín, por lo que no podemos saber con certeza si únicamente uno de ellos o los dos subtipos están implicados en los efectos de ghrelina descritos.

Es interesante mencionar que, según nuestros resultados, la ghrelina no actuaría sobre todas las células intestinales o hepáticas en las que están presentes los reguladores anorexigénicos, las enzimas digestivas o los transportadores de glucosa estudiados, sino que modularía su expresión actuando sobre pequeñas poblaciones de cada una de estas células, como demuestra la observación inmunohistoquímica de que porcentajes relativamente pequeños de células positivas a cada una de las proteínas estudiadas coexpresan el receptor GHS-R1a y, por tanto, son susceptibles de ser modificadas por ghrelina. En concreto, nuestros resultados indican que tanto los efectos inhibidores de la ghrelina sobre la expresión intestinal de CCK, PYY y GLP-1 así como los efectos estimuladores sobre la expresión intestinal de sacarasa-isomaltasa, aminopeptidasa A, lipoproteína lipasa, GLUT2, SGLT1 y SGLT2 y la expresión hepática de sacarasa-isomaltasa, tripsina y lipoproteína lipasa se producen únicamente en un 20-40% de las células que expresan cada uno de estos péptidos (Blanco *et al.*, 2017a; 2017b; *under review*). Los estudios inmunohistoquímicos presentados en la presente Tesis también han demostrado que una gran población de las células secretoras de anorexigénicos entéricos, enzimas digestivas y transportadores de glucosa en el intestino y/o el hígado del carpín también expresa ghrelina. En el caso por ejemplo de los

anorexígenos, esta observación, además de indicar la existencia en el intestino de esta especie de células capaces de secretar al menos dos péptidos diferentes, podría sugerir un rol conjunto entre la ghrelina y cada uno de estos péptidos en la modulación del balance energético y algunas funciones intestinales, como la motilidad intestinal y la digestión, si bien serían necesarios estudios adicionales para corroborar tal hipótesis.

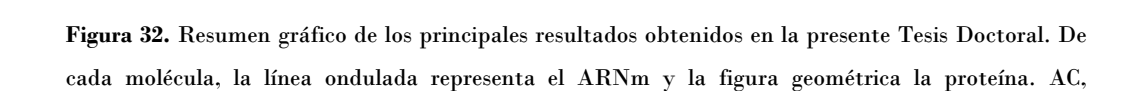
El receptor GHS-R1a, aunque también ha sido relacionado con otras vías de señalización (Yin *et al.*, 2014), emplea clásicamente un mecanismo de transducción de la señal que conlleve un incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, generalmente a través de la activación de las vías de señalización dependientes de PLC/PKC/ IP_3 o de AC/AMPc/PKA (Castañeda *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2014). ¿Se encuentran estas vías de señalización implicadas en las acciones de la ghrelina sobre la modulación de la expresión intestinal y/o hepática de enzimas digestivas y transportadores de glucosa en el carpión?. Los resultados obtenidos (capítulo 3.1.2) proporcionan una buena evidencia de la participación de las vías PLC/PKC/ IP_3 y AC/AMPc/PKA en la modulación de la ghrelina sobre la expresión de enzimas digestivas, pues prácticamente todas las inducciones de expresión génica provocadas por ghrelina son bloqueadas por un inhibidor de la PLC (U73122) o un inhibidor de la PKA (H89) (Blanco *et al.*, 2017b). Hemos observado que el receptor GHS-R1a estaría diferencialmente utilizando estas dos vías dependiendo de la enzima digestiva cuya expresión está siendo modulada en última instancia. Por ejemplo, tanto la vía de la PLC/PKC/ IP_3 como la de la AC/AMPc/PKA parecen estar mediando igualmente la inducción por parte de ghrelina de la expresión de *aminopeptidasa A* en el intestino, mientras que la inducción de la expresión de *sacarasa-isomaltasa* y de *lipoproteína lipasa* en el mismo tejido parecen estar mediadas por la vía de la PLC/PKC/ IP_3 y de la AC/AMPc/PKA, respectivamente. Además, en el hígado, los dos fármacos empleados parecen ejercer un efecto bloqueante diferencial de las acciones de ghrelina dependiendo de la concentración de esta última. Así, las acciones sobre la expresión génica de las enzimas digestivas ejercidas por concentraciones bajas o intermedias de ghrelina parecen estar mediadas a través de la vía de la PLC/PKC/ IP_3 , mientras que la vía de la AC/AMPc/PKA estaría implicada en acciones producidas por concentraciones altas de ghrelina. A diferencia de lo que ocurre con las enzimas digestivas, las inducciones ghrelinérgicas de expresión de los transportadores de glucosa en el intestino del carpión son bloqueadas por el inhibidor de la PLC, pero no por el inhibidor de la PKA (Blanco *et al.*, 2017a). Estos resultados proporcionan importantes evidencias indicando que la vía de la PLC/PKC/ IP_3 , pero probablemente no la vía de la AC/AMPc/PKA, es la responsable de la transducción de la señal intracelular que eventualmente modulará la expresión de los transportadores de glucosa tras la unión de

ghrelina a GHS-R1a. Tanto en el caso de las enzimas digestivas como de los transportadores de glucosa, si bien los trabajos incluidos en la presente Memoria proporcionan pruebas a favor de la implicación de las vías de la PLC/PKC/IP₃ y/o de la AC/AMPc/PKA en las acciones moduladoras de ghrelina sobre la expresión de estos compuestos, los resultados no excluyen la posible participación de otras vías de señalización. Sería pues de gran interés llevar a cabo un estudio exhaustivo de la posible participación de otras vías, como las cascadas de la AMPK, MAPK o mTOR, todas ellas implicadas en acciones ghrelinérgicas en mamíferos (Hardie, 2004; Mazzocchi *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014).

4. OBSERVACIONES FINALES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han permitido conocer importantes aspectos del sistema ghrelinérgico de los peces teleósteos relativos fundamentalmente a su regulación por diferentes aspectos de la alimentación y a sus acciones a nivel intestinal y hepático relacionadas con el control del apetito y funciones digestivas (**Figura 32**). Estos resultados demuestran que la alimentación es un factor clave en la síntesis y secreción de ghrelina, así como en la expresión del resto de componentes del sistema (GOAT y GHS-R), habiéndose observado que la acil-ghrelina tiene un papel como señal iniciadora de la alimentación. Asimismo, se ha descrito que la falta de alimentación conlleva una importante activación del sistema. Dado su carácter orexigénico, la ghrelina estaría respondiendo a la falta de alimento señalizando la necesidad de un incremento de la ingesta. Los resultados presentados en la presente memoria han demostrado que la acción orexigénica de la ghrelina implica (aunque no necesariamente de manera exclusiva) la inhibición de péptidos entéricos anorexigénicos, como la CCK, PYY y GLP-1.

La composición macronutritiva de la dieta, y en especial los hidratos de carbono y las grasas, también han resultado ser un importante agente potenciador de la expresión del sistema ghrelinérgico. En base a ello y al resto de los resultados presentados en esta Tesis, podríamos postular que una de las respuestas del sistema ghrelinérgico a la ingesta rica en estos macronutrientes consiste en una estimulación de la expresión génica y proteica de enzimas digestivas intestinales y hepáticas que contribuyan a su digestión. La ghrelina también facilitaría por el mismo mecanismo la disgregación de las proteínas de la dieta. Además, esta hormona parece incrementar la absorción de glucosa desde el lumen intestinal hacia la circulación, al incrementar la expresión de transportadores de glucosa así como su translocación desde el interior celular a la membrana plasmática de las células intestinales. Al mismo tiempo que promueve la absorción de glucosa a la sangre, proponemos que la



adenilato ciclasa; AG, ghrelina acilada; CCK, colecistocinina; DAG, ghrelina desacilada; GHS-R, receptor de secretagogos de la hormona de crecimiento; GLP-1, péptido análogo a glucagón-1; GLUT2, transportador de glucosa por difusión facilitada de tipo 2; GOAT, ghrelina O-aciltransferasa; PKA, proteína quinasa A; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C; PYY, péptido tirosina-tirosina; SGLT1, cotransportador sodio-glucosa de tipo 1; SGLT2, cotransportador sodio-glucosa de tipo 2.

Es importante resaltar que todas las funciones que observamos en la presente Tesis Doctoral son ejercidas por la ghrelina en su forma acilada. Esto pone de manifiesto una vez más la importancia de la GOAT en el funcionamiento del sistema ghrelinérgico de los peces, así como en el resto de vertebrados. Los resultados aquí presentados han permitido caracterizar con importante profundidad a esta enzima en el carpín, ofreciendo su secuencia génica, estructura topológica, distribución detallada a nivel central y periférico, perfil diario de expresión y regulación por producto final. Toda esta información supone un gran avance en el conocimiento del sistema ghrelinérgico de los peces y abre nuevas puertas a estudios futuros sobre posibles funciones hasta ahora desconocidas que este sistema hormonal podría estar ejerciendo en este grupo de vertebrados.



CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos y discutidos en la presente Tesis Doctoral, proponemos las siguientes conclusiones:

1. El gen que codifica para la enzima ghrelina O-aciltransferasa del carpín está formado por cuatro exones y tres intrones que dan lugar, al menos, a dos transcritos de ARNm (*goat-V1* y *goat-V2*), de los cuales *goat-V1* resulta de la transcripción total de los exones 1'-2-3, mientras que *goat-V2* es generado por *splicing* 3' alternativo en el exón 2. Las proteínas codificadas por las dos variantes son proteínas integrales de membrana (con 11 y 9 dominios transmembrana) que muestran un alto grado de conservación con la GOAT de otros vertebrados. Los elevados niveles de expresión tisular de ambas variantes en el tracto gastrointestinal, y su colocalización con ghrelina, apoyan la acilación local de la ghrelina en el intestino del carpín, y refuerzan la importancia de esta aciltransferasa en la funcionalidad del sistema ghrelinérgico a nivel intestinal.
2. La presencia de GOAT en el cerebro del carpín sugiere una posible acilación local de la ghrelina de origen central. Su expresión en áreas cerebrales que también expresan el receptor de ghrelina GHS-R1a apoya posibles acciones locales de la acil-ghrelina. Además, la presencia de GOAT en núcleos del cerebro posterior podría estar revelando hipotéticas funciones novedosas para la ghrelina en el control de la información sensorial procedente del sistema gustativo, el sistema vestibular e incluso la percepción del dolor.
3. Se describen por primera vez ritmos diarios de expresión génica de *goat* en localizaciones centrales (hipotálamo e hipófisis) y periféricas (bulbo intestinal) del carpín, que apoyan la funcionalidad del sistema ghrelinérgico como una salida endocrina del sistema circadiano. Los ritmos encontrados están en concordancia con

los ritmos previamente descritos para la *preproghrelina* y *ghs-r1a* en el mismo teleósteo, apoyando una acción coordinada del sistema. Además, la observación de que estos patrones rítmicos de expresión sólo se manifiestan en peces alimentados durante la fase diurna del ciclo de 24 h, pero no cuando la alimentación tiene lugar durante la fase nocturna, sugiere una fuerte relación entre los ritmos diarios de expresión de *goat* y el horario de alimentación.

4. La alimentación es un importante regulador del sistema ghrelinérgico del carpín, como lo demuestran las importantes variaciones periprandiales observadas en los principales componentes del sistema. La acil-ghrelina, activando el subtipo de receptor GHS-R1a1, parece actuar como señal iniciadora de la alimentación en el carpín, acción en la que el bulbo intestinal desempeñaría un papel fundamental. Áreas cerebrales como el telencéfalo y el lóbulo vagal pueden tener funciones clave en las respuestas postprandiales del sistema ghrelinérgico de este teleósteo.
5. El ayuno es un estimulador de la expresión de *preproghrelina* y *goat* en el telencéfalo y el bulbo intestinal del carpín, donde las acciones de la ghrelina estarían mediadas por el receptor del subtipo GHS-R1a2. El lóbulo vagal también parece estar implicado en las posibles respuestas del sistema ghrelinérgico frente a la falta de alimento, pero en este tejido el subtipo de receptor implicado parece ser del tipo GHS-R2.
6. La composición de la dieta modula el sistema ghrelinérgico del carpín, existiendo una regulación diferencial de la expresión de los diferentes componentes del sistema por los distintos macronutrientes. Esta regulación parece ser dependiente del tejido y de la duración del tratamiento, aunque en líneas generales podemos apuntar a que dietas enriquecidas en carbohidratos o en lípidos inducen la expresión de los componentes del sistema ghrelinérgico, mientras que una dieta rica en proteínas disminuye su expresión.
7. El silenciamiento de la expresión génica de *preproghrelina* en peces cebras conduce a alteraciones significativas en la expresión génica de importantes reguladores del apetito, corroborando el papel clave de la ghrelina en la regulación de la ingesta en los peces teleósteos. En concreto, el aumento en la expresión hipotalámica del péptido orexigénico *agrp* y la disminución de los péptidos anorexigénicos hipotalámicos *pomc* y *cart* e intestinales *prepro-ckk*, *prepro-pyy* y *proglucagon* observados en los peces cebras deficientes de ghrelina, sugieren mecanismos de compensación de los sistemas reguladores del apetito ante el déficit de ghrelina.

8. La disminución en la expresión intestinal de CCK, PYY y GLP-1 por la presencia de ghrelina en explantes primarios de intestino de carpín sugiere que en la acción orexigénica de la ghrelina podrían intervenir, además de circuitos hipotalámicos (descritos previamente), al menos estas señales entéricas de carácter anorexigénico. Esta acción de ghrelina podría ser directa en subpoblaciones celulares productoras de cada una de estos reguladores entéricos anorexigénicos, ya que muestran colocalización con el receptor de ghrelina del subtipo GHS-R1a.
9. Se propone, por primera vez en los peces, que la ghrelina puede estar implicada en la regulación de la digestión enzimática. A favor de esta propuesta hemos encontrado que la expresión de importantes enzimas responsables de la digestión de los principios inmediatos incrementa por el tratamiento *in vitro* con ghrelina en el intestino y el hígado del carpín. Además, los peces cebra *knockdown* para *preproghrelina* muestran, como cabría esperar, menores niveles de transcritos de la mayoría de dichas enzimas en ambas localizaciones. Esta función reguladora de la digestión parece estar mediada por el receptor del subtipo GHS-R1a, activando las vías de señalización intracelular de la PLC/PKC/IP₃ o de la AC/AMPc/PKA, en función del tipo celular y de la enzima digestiva estudiada.
10. La ghrelina puede modular el transporte de glucosa a través de las paredes intestinales de los teleosteos, pues estimula la expresión de los principales transportadores intestinales de glucosa (GLUT2, SGLT1 y SGLT2) e incrementa la tasa de translocación de GLUT2 a la membrana plasmática de las células intestinales del carpín. La modulación ghrelinérgica de la expresión génica de los transportadores de glucosa está mediada por el receptor GHS-R1a presente en las células intestinales y la activación de la vía de la PLC/PKC/IP₃. El hecho de que la expresión génica de *glut2* y *splt1* disminuya significativamente en el intestino de peces cebra *knockdown* para *preproghrelina* apoya esta conclusión. Nuestros resultados indican, además, que existe una regulación recíproca entre la glucosa y la ghrelina en el carpín, como lo demuestra la doble observación de una modulación por ghrelina de los transportadores de glucosa, y una estimulación por glucosa del sistema ghrelinérgico del carpín.



A

- Adam TC, Epel ES (2007) Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav* 91: 449-458.
- Adrio F, Anadón R, Rodríguez-Moldes I (2002) Distribution of tyrosine hydroxylase (TH) and dopamine beta-hydroxylase (DBH) immunoreactivity in the central nervous system of two chondrosteian fishes (*Acipenser baeri* and *Huso huso*). *J Comp Neurol* 448: 280-297.
- Akash G, Kaniganti T, Tiwari NK, Subhedar NK, Ghose A (2014) Differential distribution and energy status-dependent regulation of the four CART neuropeptide genes in the zebrafish brain. *J Comp Neurol* 522: 2266-2285.
- Al Massadi O, Tschöp MH, Tong J (2011) Ghrelin acylation and metabolic control. *Peptides* 32: 2301-2308.
- Alamri BN, Shin K, Chappe V, Anini Y (2016) The role of ghrelin in the regulation of glucose homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig* 26: 3-11.
- Alonso-Gómez AL, Valenciano AI, Alonso-Bedate M, Delgado MJ (2000) Melatonin synthesis in the greenfrog retina in culture: I. Modulation by the light/dark cycle, forskolin and inhibitors of protein synthesis. *Life Sci* 66: 675-685.
- Álvarez-Crespo M, Skibicka KP, Farkas I, Molnár CS, Egecioglu E, Hrabovszky E, Liposits Z, Dickson SL (2012) The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats: neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence. *PLoS ONE* 7: e46321.
- Amano M, Takahashi A, Oka Y, Yamanome T, Kawauchi H, Yamamori K (2003) Immunocytochemical localization and ontogenic development of melanin-concentrating hormone in the brain of a pleuronectiform fish, the barfin flounder. *Cell Tissue Res* 311: 71-77.
- Amano M, Takahashi A, Yamanome T, Oka Y, Amiya N, Kawauchi H, Yamamori K (2005) Immunocytochemical localization and ontogenic development of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH) in the brain of a pleuronectiform fish, barfin flounder. *Cell Tissue Res* 320: 127-134.
- Amole N, Unniappan S (2009) Fasting induces preproghrelin mRNA expression in the brain and gut of zebrafish, *Danio rerio*. *Gen Comp Endocrinol* 161: 133-137.
- An W, Li Y, Xu G, Zhao J, Xiang X, Ding L, Li J, Guan Y, Wang X, Tang C *et al.* (2010) Modulation of ghrelin O-acyltransferase expression in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem* 26: 707-716.
- Anand BK, Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24: 123-140.

- Ando H, Hasegawa M, Ando J, Urano A (1999) Expression of salmon corticotropin-releasing hormone precursor gene in the preoptic nucleus in stressed rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 113: 87-95.
- Andrews ZB, Liu Z-W, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschöp MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI *et al.* (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454: 846-851.
- Angeloni SV, Glynn N, Ambrosini G, Garant MJ, Higley JD, Suomi S, Hansen BC (2004) Characterization of the rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology* 145: 2197-2205.
- Arcamone N, Neglia S, Gargiulo G, Esposito V, Varricchio E, Battaglini P, De Girolamo P, Russo F (2009) Distribution of ghrelin peptide in the gastrointestinal tract of stomachless and stomach-containing teleosts. *Microsc Res Tech* 72: 525-533.
- Ariyasu H, Takaya K, Hosoda H, Iwakura H, Ebihara K, Mori K, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M *et al.* (2002) Delayed short-term secretory regulation of ghrelin in obese animals: evidenced by a specific RIA for the active form of ghrelin. *Endocrinology* 143: 3341-3350.
- Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S *et al.* (2001) Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4753-4758.
- Asakawa A, Inui A, Fujimiya M, Sakamaki R, Shinfuku N, Ueta Y, Meguid MM, Kasuga M (2005) Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 54: 18-24.
- Asakawa A, Inui A, Kaga T, Katsuura G, Fujimiya M, Fujino MA, Kasuga M (2003) Antagonism of ghrelin receptor reduces food intake and body weight gain in mice. *Gut* 52: 947-952.
- Asimakopoulos B (2012) Hypothalamus-pituitary-gonadal axis: it is time for revision. *Human Genet Embryol* 2: e106.
- Avau B, Bauters D, Steensels S, Vancleef L, Laermans J, Lesuisse J, Buyse J, Lijnen HR, Tack J, Depoortere I (2015) The gustatory signaling pathway and bitter taste receptors affect the development of obesity and adipocyte metabolism in mice. *PLoS ONE* 10: e0145538.
- Ayada C, Toru Ü, Korkut Y (2015) Nesfatin-1 and its effects on different systems. *Hippokratia* 19: 4-10.
- Aydin S (2014) Three new players in energy regulation: preptin, adropin and irisin. *Peptides* 56: 94-110.
- Azpeleta C (2013) Melatonina en la regulación de las respuestas al estrés en teleósteos. Efectos comportamentales y acciones en el eje hipotálamo-hipófisis-interrenal. Tesis Doctoral.

B

- Babaei-Balderlou F, Khazali H (2016) Effects of ghrelin on sexual behavior and luteinizing hormone beta-subunit gene expression in male rats. *J Reprod Infertil* 17: 88-96.
- Baldanzi G (2002) Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *J Cell Biol* 159: 1029-1037.
- Banasch M, Bulut K, Hagemann D, Schrader H, Holst JJ, Schmidt WE, Meier JJ (2006) Glucagon-like peptide 2 inhibits ghrelin secretion in humans. *Regul Pept* 137: 173-178.
- Baptista V, Zheng ZL, Coleman FH, Rogers RC, Travagli RA (2005) Cholecystokinin octapeptide increases spontaneous glutamatergic synaptic transmission to neurons of the nucleus tractus solitarius centralis. *J Neurophysiol* 94: 2763-2771.
- Barazzoni R, Bosutti A, Stebel M, Cattin MR, Roder E, Visintin L, Cattin L, Biolo G, Zanetti M, Guarnieri G (2005) Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E228-E235.
- Batterham RL, Cohen MA, Ellis SM, Le Roux CW, Withers DJ, Frost GS, Ghatei MA, Bloom SR (2003) Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *N Engl J Med* 349: 941-948.
- Bayliss JA, Andrews ZB (2013) Ghrelin is neuroprotective in Parkinson's disease: molecular mechanisms of metabolic neuroprotection. *Ther Adv Endocrinol Metab* 4: 25-36.
- Bayliss JA, Lemus MB, Stark R, Santos VV, Thompson A, Rees DJ, Galic S, Elsworth JD, Kemp BE, Davies JS, Andrews ZB (2016) Ghrelin-AMPK signaling mediates the neuroprotective effects of calorie restriction in Parkinson's disease. *J Neurosci* 36: 3049-3063.
- Bechtold DA, Luckman SM (2007) The role of RFamide peptides in feeding. *J Endocrinol* 192: 3-15.
- Beck B, Musse N, Stricker-Krongrad A (2002) Ghrelin, macronutrient intake and dietary preferences in long-evans rats. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 1031-1035.
- Beck B, Richy S (2008) Differential long-term dietary regulation of adipokines, ghrelin, or corticosterone: impact on adiposity. *J Endocrinol* 196: 171-179.
- Beiras-Fernandez A, Kreth S, Weis F, Ledderose C, Pöttinger T, Diéguez C, Beiras A, Reichart B (2010) Altered myocardial expression of ghrelin and its receptor (GHSR-1a) in patients with severe heart failure. *Peptides* 31: 2222-2228.
- Benso A, Calvi E, Gramaglia E, Olivetti I, Tomellini M, Ghigo E, Broglio F (2013) Other than growth hormone neuroendocrine actions of ghrelin. *Endocr Dev* 25: 59-68.
- Bernardis LL, Bellinger LL (1993) The lateral hypothalamic area revisited: neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. *Neurosci Biobehav Rev* 17: 141-193.

- Bernier NJ, Peter RE (2001) Appetite-suppressing effects of urotensin I and corticotropin-releasing hormone in goldfish (*Carassius auratus*). *Neuroendocrinology* 73: 248-260.
- Besseau L, Vuilleumier R, Sauzet S, Boeuf G, Falcón J (2007) Photoperiodic control of melatonin synthesis in fish pineal and retina. *J Soc Biol* 201: 13-20.
- Blanco AM, Bertucci JI, Delgado MJ, Valenciano AI, Unniappan S (2016a) Tissue-specific expression of ghrelinergic and NUCB2/nesfatin-1 systems in goldfish (*Carassius auratus*) is modulated by macronutrient composition of diets. *Comp Biochem Physiol A* 195: 1-9.
- Blanco AM, Bertucci JI, Ramesh N, Delgado MJ, Valenciano AI, Unniappan S (2017a) Ghrelin facilitates GLUT2-, SGLT1- and SGLT2-mediated intestinal glucose transport in goldfish (*Carassius auratus*). *Sci Rep* 7: 45024.
- Blanco AM, Bertucci JI, Sánchez-Bretaña A, Delgado MJ, Valenciano AI, Unniappan S (2017b) Ghrelin modulates gene and protein expression of digestive enzymes in the intestine and hepatopancreas of goldfish (*Carassius auratus*) via the GHS-R1a: possible roles of PLC/PKC and AC/PKA intracellular signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol* 442: 165-181.
- Blanco AM, Bertucci JI, Valenciano AI, Delgado MJ, Unniappan S (2017) Ghrelin suppresses cholecystokinin (CCK), peptide YY (PYY) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in the intestine, and attenuates the anorectic effects of CCK, PYY and GLP-1 in goldfish (*Carassius auratus*). *Horm Behav (Under review)*.
- Blanco AM, Gómez-Boronat M, Alonso-Gómez AL, Yufa R, Unniappan S, Delgado MJ, Valenciano AI (2017c) Characterization of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in goldfish (*Carassius auratus*). *PLoS ONE* 12: e0171874.
- Blanco AM, Gómez-Boronat M, Redondo I, Valenciano AI, Delgado MJ (2016b) Periprandial changes and effects of short- and long-term fasting on ghrelin, GOAT, and ghrelin receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *J Comp Physiol B* 186: 727-738.
- Blanco AM, Sánchez-Bretaña A, Delgado MJ, Valenciano AI (2016c) Brain mapping of ghrelin O-acyltransferase in goldfish (*Carassius auratus*): novel roles for the ghrelinergic system in fish? *Anat Rec* 299: 748-758.
- Blanco AM, Sundarajan L, Bertucci JI, Unniappan S (2017d) Why goldfish? Merits and challenges in employing goldfish as a model organism in comparative endocrinology research. *Gen Comp Endocrinol pii*: S0016-6480.
- Blouet C, Schwartz GJ (2010) Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* 209: 1-12.
- Bodnar RJ (2015) Endogenous opioids and feeding behavior: A decade of further progress (2004-2014). A Festschrift to Dr. Abba Kastin. *Peptides* 72: 20-33.
- Boguszewski CL, van der Lely AJ (2015) The role of the gastrointestinal tract in the control of energy balance. *Transl Gastrointest Cancer* 4: 3-13.
- Braasch I, Postlethwait JH (2012) Polyploidy in fish and the teleost genome duplication.

- En: *Polyploidy and Genome Evolution* (PS Soltis y DE Soltis, eds), Springer, Berlín, Alemania. pp. 341-383.
- Bray GA, Fisler J, York DA (1990) Neuroendocrine control of the development of obesity: understanding gained from studies of experimental animal models. *Front Neuroendocrinol* 11: 128-181.
- Breves JP, Veillette PA, Specker JL (2009) Ghrelin in the summer flounder: Immunolocalization to the gastric glands and action on plasma cortisol levels. *Comp Biochem Physiol A* 152: 268-272.
- Briatore L, Andraghetti G, Cordera R (2003) Acute plasma glucose increase, but not early insulin response, regulates plasma ghrelin. *Eur J Endocrinol* 149: 403-406.
- Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E (2001) Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5083-5086.
- Broglio F, Gottero C, Prodam F, Destefanis S, Gauna C, Me E, Riganti F, Vivenza D, Rapa A, Martina V *et al.* (2004a) Ghrelin secretion is inhibited by glucose load and insulin-induced hypoglycaemia but unaffected by glucagon and arginine in humans. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61: 503-509.
- Broglio F, Gottero C, Van Koetsveld P, Prodam F, Destefanis S, Benso A, Gauna C, Hofland L, Arvat E, van der Lely AJ, Ghigo E (2004b) Acetylcholine regulates ghrelin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2429-2433.
- Buss J, Havel PJ, Epel E, Lin J, Blackburn E, Daubenmier J (2014) Associations of ghrelin with eating behaviors, stress, metabolic factors, and telomere length among overweight and obese women: Preliminary evidence of attenuated ghrelin effects in obesity? *Appetite* 76: 84-94.
- Butt ZD, Hackett JD, Volkoff H (2017) Irisin in goldfish (*Carassius auratus*): effects of irisin injections on feeding behavior and expression of appetite regulators, uncoupling proteins and lipoprotein lipase, and fasting-induced changes in FNDC5 expression. *Peptides* 90: 27-36.

C

- Callaghan B, Furness JB (2014) Novel and conventional receptors for ghrelin, desacyl-ghrelin, and pharmacologically related compounds. *Pharmacol Rev* 66: 984-1001.
- Camina JP, Carreira MC, El Messari S, Llorens-Cortes C, Smith RG, Casanueva FF (2004) Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 145: 930-940.
- Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytán F, Sanchez-Criado JE, Barreiro ML, Nogueiras R, Casanueva FF, Aguilar E, Diéguez C (2003) Expression of ghrelin in the cyclic and

- pregnant rat ovary. *Endocrinology* 144: 1594-1602.
- Cansell C, Castel J, Denis RGP, Rouch C, Delbes A-S, Martinez S, Mestivier D, Finan B, Maldonado-Aviles JG, Rijnsburger M *et al.* (2014) Dietary triglycerides act on mesolimbic structures to regulate the rewarding and motivational aspects of feeding. *Mol Psychiatry* 19: 1095-1105.
- Cao C, Chen Y, Wang W, Liu Y, Liu G (2011) Ghrelin inhibits insulin resistance induced by glucotoxicity and lipotoxicity in cardiomyocyte. *Peptides* 32: 209-215.
- Carlini VP, Varas MM, Cragnolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR (2004) Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 635-641.
- Carreira MC, Crujeiras AB, Andrade S, Monteiro MP, Casanueva FF (2013) Ghrelin as a GH-releasing factor. *Endocr Dev* 25: 49-58.
- Casanueva FF, Camina JP, Carreira MC, Pazos Y, Varga JL, Schally AV (2008) Growth hormone-releasing hormone as an agonist of the ghrelin receptor GHS-R1a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20452-20457.
- Casanueva FF, Diéguez C (2005) Leptin and ghrelin: what is the impact on pituitary function? *Rev Endocr Metab Disord* 6: 39-45.
- Castañeda TR, Tong J, Datta R, Culler M, Tschöp MH (2010) Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 31: 44-60.
- Cerdá-Reverter JM, Anglade I, Martínez-Rodríguez G, Mazurais D, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M, Kah O, Zanuy S (2000) Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 19: 197-210.
- Cerdá-Reverter JM, Peter RE (2003) Endogenous melanocortin antagonist in fish: structure, brain mapping, and regulation by fasting of the goldfish agouti-related protein gene. *Endocrinology* 144: 4552-4561.
- Cerdá-Reverter JM, Schiöth HB, Peter RE (2003) The central melanocortin system regulates food intake in goldfish. *Regul Pept* 115: 101-113.
- Chacko SK, Haymond MW, Sun Y, Marini JC, Sauer PJJ, Ma X, Sunehag AL (2012) Effect of ghrelin on glucose regulation in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1055-E1062.
- Chan CB, Cheng CH. (2004) Identification and functional characterization of two alternatively spliced growth hormone secretagogue receptor transcripts from the pituitary of black seabream *Acanthopagrus schlegelii*. *Mol Cell Endocrinol* 214: 81-95.
- Chan CB, Fung CK, Fung W, Tse MCL, Cheng CHK (2004) Stimulation of growth hormone secretion from seabream pituitary cells in primary culture by growth hormone secretagogues is independent of growth hormone transcription. *Comp Biochem Physiol C* 139: 77-85.

- Chang SC, Magee AI (2009) Acyltransferases for secreted signalling proteins (Review). *Mol Membr Biol* 26: 104-113.
- Chaudhri O, Small C, Bloom S (2006) Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 361: 1187-1209.
- Chaudhry RM, Scow JS, Madhavan S, Duenes JA, Sarr MG (2012) Acute enterocyte adaptation to luminal glucose: a posttranslational mechanism for rapid apical recruitment of the transporter GLUT2. *J Gastrointest Surg* 16: 312-319.
- Chelikani PK, Haver AC, Reidelberger RD (2006) Ghrelin attenuates the inhibitory effects of glucagon-like peptide-1 and peptide YY(3-36) on food intake and gastric emptying in rats. *Diabetes* 55: 3038-3046.
- Chen C, Wu D, Clarke IJ (1996) Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol* 148: 381-386.
- Chen CY, Inui A, Asakawa A, Fujino K, Kato I, Chen CC, Ueno N, Fujimiya M (2005a) Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in conscious rats. *Gastroenterology* 129: 8-25.
- Chen H, Zhang X, Hao J, Chen D, Liu J, Gao Y, Zhu J, Wu H, Lin F, Pu Y *et al.* (2015) Molecular cloning, expression analysis, and appetite regulatory effect of peptide YY in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). *Gene* 563: 172-179.
- Chen T, Tang Z, Yan A, Li W, Lin H (2008) Molecular cloning and mRNA expression analysis of two GH secretagogue receptor transcripts in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *J Endocrinol* 199: 253-265.
- Chen X, Ge Y-L, Jiang Z-Y, Liu C-Q, Depoortere I, Peeters TL (2005b) Effects of ghrelin on hypothalamic glucose responding neurons in rats. *Brain Res* 1055: 131-136.
- Cheng HL, Wang X, Peng, YX, Meng XP, Sun SP, Shi XY (2009) Molecular cloning and tissue distribution of lipoprotein lipase full-length cDNA from Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). *Comp Biochem Physiol B* 153: 109-115.
- Chiquete E, Tolosa P (2013) Conceptos tradicionales y emergentes sobre el balance energético. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 21: 59-68.
- Chow KBS, Sun J, Chu KM, Tai Cheung W, Cheng CHK, Wise H (2012) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol Cell Endocrinol* 348: 247-254.
- Chuang J-C, Sakata I, Kohno D, Perello M, Osborne-Lawrence S, Repa JJ, Zigman JM (2011) Ghrelin directly stimulates glucagon secretion from pancreatic alpha-cells. *Mol Endocrinol* 25: 1600-1611.
- Chuang J-C, Zigman JM (2010) Ghrelin's roles in stress, mood, and anxiety regulation. *Int J Pept* 2010: 1-5.
- Chung S, Son GH, Kim K (2011) Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta* 1812: 581-591.

- Conde-Sieira M, Bonacic K, Velasco C, Valente LMP, Morais S, Soengas JL (2015) Hypothalamic fatty acid sensing in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): response to long-chain saturated, monounsaturated, and polyunsaturated (n-3) fatty acids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309: R1521-1531.
- Conde-Sieira M, Soengas JL (2016) Nutrient sensing systems in fish: impact on food intake regulation and energy homeostasis. *Front Neurosci* 10: 603.
- Coon SL, Bégay V, Deurloo D, Falcón J, Klein DC (1999) Two arylalkylamine N-acetyltransferase genes mediate melatonin synthesis in fish. *J Biol Chem* 274: 9076-9082.
- Cristino L, Becker T, Di Marzo V (2014) Endocannabinoids and energy homeostasis: an update: regulatory role of endocannabinoids in obesity. *BioFactors* 40: 389-397.
- Crow KD, Wagner (2006) What is the role of genome duplication in the evolution of complexity and diversity? *Mol Biol Evol* 23: 887-892.
- Cruz SA, Tseng Y-C, Kaiya H, Hwang PP (2010) Ghrelin affects carbohydrate-glycogen metabolism via insulin inhibition and glucagon stimulation in the zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Comp Biochem Physiol A* 156: 190-200.
- Cui C, Ohnuma H, Daimon M, Susa S, Yamaguchi H, Kameda W, Jimbu Y, Oizumi T, Kato T (2008) Ghrelin infused into the portal vein inhibits glucose-stimulated insulin secretion in Wistar rats. *Peptides* 29: 1241-1246.
- Cummings DE (2006) Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol Behav* 89: 71-84.
- Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS (2001) A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50: 1714-1719.

D

- Damian M, Marie J, Leyris J-P, Fehrentz J-A, Verdié P, Martinez J, Banères J-L, Mary S (2012) High constitutive activity is an intrinsic feature of ghrelin receptor protein: a study with a functional monomeric GHS-R1a receptor reconstituted in lipid discs. *J Biol Chem* 287: 3630-3641.
- Danger JM, Breton B, Vallarino M, Fournier A, Pelletier G, Vaudry H (1991) Neuropeptide-Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. *Endocrinology* 128: 2360-2368.
- Darling JE, Zhao F, Loftus RJ, Patton LM, Gibbs RA, Hougland JL (2015) Structure-activity analysis of human ghrelin O-acyltransferase reveals chemical determinants of ghrelin selectivity and acyl group recognition. *Biochemistry* 54: 1100-1110.

- Dass NB, Munonyara M, Bassil AK, Hervieu GJ, Osbourne S, Corcoran S, Morgan M, Sanger GJ (2003) Growth hormone secretagogue receptors in rat and human gastrointestinal tract and the effects of ghrelin. *Neuroscience* 120: 443-453.
- Date Y, Kojima M, Hosoda H, Sawaguchi A, Mondal MS, Suganuma T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000) Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141: 4255-4261.
- Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M (2002) The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123: 1120-1128.
- Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S (2001) Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 904-907.
- Date Y, Toshinai K, Koda S, Miyazato M, Shimbara T, Tsuruta T, Nijima A, Kangawa K, Nakazato M (2005) Peripheral interaction of ghrelin with cholecystokinin on feeding regulation. *Endocrinology* 146: 3518-3525.
- de Pedro N, Martínez-Alvarez R, Delgado MJ (2006) Acute and chronic leptin reduces food intake and body weight in goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol* 188: 513-520.
- De Silva SS, Trevor AA (1995) Feeding in cultured finfish. En: *Fish Nutrition in Aquaculture* (SS De Silva y AA Trevor, eds), Chapman & Hall, Londres, Reino Unido. pp. 211-247.
- De Vriese C, Delporte C (2008) Ghrelin: a new peptide regulating growth hormone release and food intake. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1420-1424.
- De Vriese C, Gregoire F, Lema-Kisoka R, Waelbroeck M, Robberecht P, Delporte C (2004) Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates: identification of the cleavage sites. *Endocrinology* 145: 4997-5005.
- De Vriese C, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C (2007) Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* 148: 2355-2362.
- De Vriese C, Perret J, Delporte C (2010) Focus on the short- and long-term effects of ghrelin on energy homeostasis. *Nutrition* 26: 579-584.
- Dehal P, Boore JL (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate *PLoS Biol* 3: e314.
- Del Prete A, Iadevaia M, Loguercio C (2012) The role of gut hormones in controlling the food intake. What is their role in emerging diseases? *Endocrinol Nutr* 59: 197-206.
- Delgado MJ, Cerdá-Reverter JM, Soengas JL (2017) Hypothalamic integration of metabolic, endocrine, and circadian signals in fish: involvement in the control of food intake. *Front Neurosci (Under review)*.
- Delhanty PJD, van der Lely AJ (2011) Ghrelin and glucose homeostasis. *Peptides* 32: 2309-2318.

- Delhanty PJD, Neggers SJ, van der Lely AJ (2012). Mechanisms in endocrinology: Ghrelin: the differences between acyl- and des-acyl ghrelin. *Eur J Endocrinol* 167: 601-608.
- Delporte C (2013) Structure and physiological actions of ghrelin. *Scientifica* 2013: 1-25.
- Dezaki K (2013) Ghrelin function in insulin release and glucose metabolism. En: *The ghrelin system. Vol. 25 Endocrine Development* (A Benso, FF Casanueva, E Ghigo y R Granata, eds), Karger AG, Basilea, Suiza. pp. 135-143.
- Dezaki K, Hosoda H, Kakei M, Hashiguchi S, Watanabe M, Kangawa K, Yada T (2004) Endogenous ghrelin in pancreatic islets restricts insulin release by attenuating Ca^{2+} signaling in beta-cells: implication in the glycemic control in rodents. *Diabetes* 53: 3142-3151.
- Diano S, Farr SA, Benoit SC, McNay EC, da Silva I, Horvath B, Gaskin FS, Nonaka N, Jaeger LB, Banks WA *et al.* (2006) Ghrelin controls hippocampal spine synapse density and memory performance. *Nat Neurosci* 9: 381-388.
- Díaz ML, Becerra M, Manso MJ, Anadón R (2002) Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) immunoreactivity in the brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* 450: 45-60.
- Dijk D-J, Duffy JF, Riel E, Shanahan TL, Czeisler CA (1999) Ageing and the circadian and homeostatic regulation of human sleep during forced desynchrony of rest, melatonin and temperature rhythms. *J Physiol* 516: 611-627.
- Dockray GJ (2009) Cholecystokinin and gut-brain signalling. *Regul Pept* 155: 6-10.
- Dockray GJ (2012) Cholecystokinin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19: 8-12.
- Dornonville de la Cour C, Lindström E, Norlén P, Håkanson R (2004) Ghrelin stimulates gastric emptying but is without effect on acid secretion and gastric endocrine cells. *Regul Pept* 120: 23-32.
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z *et al.* (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123: 37-46.
- Du GM, Wu JG, Luo BP, Hu ZH, Li LA, Liu MJ (2016) RNAi-mediated ghrelin affects gastric H^{+} - K^{+} -ATPase activity and expression of GOAT-ghrelin system *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 228: 48-52.
- Dupont J, Maillard V, Coyral-Castel S, Ramé C, Froment P (2010) Ghrelin in female and male reproduction. *Int J Pept* 2010: 158102.

E

- Egecioglu E, Jerlhag E, Salomé N, Skibicka KP, Haage D, Bohlooly-Y M, Andersson D, Bjursell M, Perrissoud D, Engel JA, Dickson SL (2010) Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents: Ghrelin and food reward. *Addict Biol* 15: 304-311.

- Einarsdóttir IE, Power DM, Jönsson E, Björnsson BT (2011) Occurrence of ghrelin-producing cells, the ghrelin receptor and Na⁺,K⁺-ATPase in tissues of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development. *Cell Tissue Res* 344: 481-498.
- Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22: 221-232.
- Eom J, Hong A, Kang YH, Yoo HJ, Chang EJ, Kang SW, Yoon SY, Kim SY, Song Y (2014) Molecular cloning, regulation, and functional analysis of two GHS-R genes in zebrafish. *Exp Cell Res* 326: 10-21.

F

- Fang P, Yu M, Guo L, Bo P, Zhang Z, Shi M (2012) Galanin and its receptors: a novel strategy for appetite control and obesity therapy. *Peptides* 36: 331-339.
- Fang PH, Yu M, Ma YP, Li J, Sui YM, Shi MY (2011) Central nervous system regulation of food intake and energy expenditure: role of galanin-mediated feeding behavior. *Neurosci Bull* 27: 407-412.
- Feliciano A, Vivas Y, de Pedro N, Delgado MJ, Velarde E, Isorna E (2011) Feeding time synchronizes clock gene rhythmic expression in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). *J Biol Rhythms* 26: 24-33.
- Feltrin KL, Patterson M, Ghati MA, Bloom SR, Meyer JH, Horowitz M, Feinle-Bisset C (2006) Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men. *Peptides* 27: 1638-1643.
- Feng K, Zhang GR, Wei KJ, Xiong BX (2013) Molecular cloning, tissue distribution, and ontogenetic expression of ghrelin and regulation of expression by fasting and refeeding in the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *J Exp Zool A* 319: 202-212.
- Fernández G, Cabral A, Cornejo MP, De Francesco PN, García-Romero G, Reynaldo M, Perello M (2016) Des-acyl ghrelin directly targets the arcuate nucleus in a ghrelin-receptor independent manner and impairs the orexigenic effect of ghrelin. *J Neuroendocrinol* 28: 12349.
- Ferrini F, Salio C, Lossi L, Merighi A (2009) Ghrelin in central neurons. *Curr Neuroparmacol* 7: 37-49.
- Filigheddu N, Gnocchi VF, Coscia M, Cappelli M, Porporato PE, Taulli R, Traini S, Baldanzi G, Chianale F, Cutrupi S *et al.* (2007) Ghrelin and des-acyl ghrelin promote differentiation and fusion of C2C12 skeletal muscle cells. *Mol Biol Cell* 18: 986-994.
- Filippi BM, Abraham MA, Yue JTY, Lam TKT (2013). Insulin and glucagon signaling in the central nervous system. *Rev Endocr Metab Disord* 14: 365-375.
- Findeisen M, Rathmann D, Beck-Sickinger AG (2011) RFamide peptides: structure, function, mechanisms and pharmaceutical potential. *Pharmaceuticals* 4: 1248-1280.

- Finger TE (2008) Sorting food from stones: the vagal taste system in goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Physiol A* 194: 135-143.
- Forlano PM, Cone RD (2007) Conserved neurochemical pathways involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J Comp Neurol* 505: 235-248.
- Fox BK, Breves JP, Hirano T, Grau EG (2009) Effects of short- and long-term fasting on plasma and stomach ghrelin, and the growth hormone/insulin-like growth factor I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Domest Anim Endocrinol* 37: 1-11.
- Frecka JM, Mattes RD (2008) Possible entrainment of ghrelin to habitual meal patterns in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G699-G707.
- Friedman J (2014) 20 years of leptin: leptin at 20: an overview. *J Endocrinol* 223: T1-T8.
- Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Argente-Arizón P, Díaz F, Granado M, Freire-Regatillo A, Castro-González D, Ceballos ML, Frago LM, Dickson SL *et al.* (2016) Ghrelin regulates glucose and glutamate transporters in hypothalamic astrocytes. *Sci Rep* 6: 23673.
- Fujimiya M, Ataka K, Asakawa A, Chen C-Y, Kato I, Inui A (2012) Regulation of gastroduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides. *Digestion* 85: 90-94.
- Fukumori R, Sugino T, Shingu H, Moriya N, Kobayashi H, Hasegawa Y, Kojima M, Kangawa K, Obitsu T, Kushibiki S, Taniguchi K (2013) Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin. *Domest Anim Endocrinol* 45: 216-223.
- Furuse M, Tachibana T, Ohgushi A, Ando R, Yoshimatsu T, Denbow DM (2001) Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett* 301: 123-126.

G

- Gagnon J, Anini Y (2012) Insulin and norepinephrine regulate ghrelin secretion from a rat primary stomach cell culture. *Endocrinology* 153: 3646-3656.
- Gahete MD, Córdoba-Chacón J, Hergueta-Redondo M, Martínez-Fuentes AJ, Kineman RD, Moreno-Bueno G, Luque RM, Castaño JP (2011) A novel human ghrelin variant (In1-ghrelin) and ghrelin-O-acyltransferase are overexpressed in breast cancer: potential pathophysiological relevance. *PLoS ONE* 6: e23302.
- Gahete MD, Córdoba-Chacón J, Salvatori R, Castaño JP, Kineman RD, Luque RM (2010) Metabolic regulation of ghrelin O-acyl transferase (GOAT) expression in the mouse hypothalamus, pituitary, and stomach. *Mol Cell Endocrinol* 317: 154-160.
- Gahete MD, Rincón-Fernández D, Villa-Osaba A, Hormaechea-Agulla D, Ibáñez-Costa A, Martínez-Fuentes AJ, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Luque RM (2014) Ghrelin gene

- products, receptors, and GOAT enzyme: biological and pathophysiological insight. *J Endocrinol* 220: R1-R24.
- Gaikwad A, Biju KC, Saha SG, Subhedar N (2004) Neuropeptide Y in the olfactory system, forebrain and pituitary of the teleost, *Clarias batrachus*. *J Chem Neuroanat* 27: 55-70.
- Galas L, Chartrel N, Kojima M, Kangawa K, Vaudry H (2002) Immunohistochemical localization and biochemical characterization of ghrelin in the brain and stomach of the frog *Rana esculenta*. *J Comp Neurol* 450: 34-44.
- García-Fernández JM, del Brío MA, Cernuda R, Coto A, Riera P (1992) Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of *Salmo salar* and *Gambusia affinis*. *Histol Histopathol* 7: 385-392.
- Gardiner JV, Beale KE, Roy D, Boughton CK, Bataveljic A, Campbell DC, Bewick GA, Patel NA, Patterson M, Leavy EM *et al.* (2010) Cerebellin1 is a novel orexigenic peptide. *Diabetes Obes Metab* 12: 883-890.
- Gauna C, Delhanty PJD, Hofland LJ, Janssen JAMJL, Broglio F, Ross RJM, Ghigo E, van der Lely AJ (2005) Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 1055-1060.
- Gauna C, Kiewiet RM, Janssen JAMJL, van de Zande B, Delhanty PJD, Ghigo E, Hofland LJ, Themmen APN, van der Lely AJ (2007) Unacylated ghrelin acts as a potent insulin secretagogue in glucose-stimulated conditions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E697-E704.
- Gesmund I, Gallo D, Favaro E, Ghigo E, Granata R (2013) Obestatin: a new metabolic player in the pancreas and white adipose tissue. *IUBMB Life* 65: 976-982.
- Ghelardoni S, Carnicelli V, Frascarelli S, Ronca-Testoni S, Zucchi R (2006) Ghrelin tissue distribution: comparison between gene and protein expression. *J Endocrinol Invest* 29: 115-121.
- Gil-Campos M, Aguilera CM, Cañete R, Gil A (2006) Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr* 96: 201-226.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M (2002) The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2988.
- Goebel-Stengel M, Hofmann T, Elbelt U, Teuffel P, Ahnis A, Kobelt P, Lambrecht NWG, Klapp BF, Stengel A (2013) The ghrelin activating enzyme ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) is present in human plasma and expressed dependent on body mass index. *Peptides* 43: 13-19.
- Gomez G, Han S, Englander EW, Greeley GH (2012) Influence of a long-term high-fat diet on ghrelin secretion and ghrelin-induced food intake in rats. *Regul Pept* 173: 60-63.
- Gómez R, Lago F, Gómez-Reino JJ, Diéguez C, Gualillo O (2009) Expression and modulation of ghrelin O-acyltransferase in cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum* 60:

1704-1709.

- González CR, Vázquez MJ, López M, Diéguez C (2008) Influence of chronic undernutrition and leptin on GOAT mRNA levels in rat stomach mucosa. *J Mol Endocrinol* 41: 415-421.
- Gonzalez R, Kerbel B, Chun A, Unniappan S (2010) Molecular, cellular and physiological evidences for the anorexigenic actions of nesfatin-1 in goldfish. *PLoS ONE* 5: e15201.
- Gonzalez R, Unniappan S (2010) Molecular characterization, appetite regulatory effects and feeding related changes of peptide YY in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 166: 273-279.
- Gorboulev V, Schürmann A, Vallon V, Kipp H, Jaschke A, Klessen D, Friedrich A, Scherneck S, Rieg T, Cunard R *et al.* (2012) Na⁽⁺⁾-D-glucose cotransporter SGLT1 is pivotal for intestinal glucose absorption and glucose-dependent incretin secretion. *Diabetes* 61: 187-196.
- Gorissen M, Flik G (2014) Leptin in teleostean fish, towards the origins of leptin physiology. *J Chem Neuroanat* 61–62, 200-206.
- Gormsen LC, Gjedsted J, Gjedde S, Vestergaard ET, Christiansen JS, Jørgensen JO, Nielsen S, Møller N (2006) Free fatty acids decrease circulating ghrelin concentrations in humans. *Eur J Endocrinol* 154: 667-673.
- Gormsen LC, Nielsen C, Gjedsted J, Gjedde S, Vestergaard ET, Christiansen JS, Jørgensen JO, Møller N (2007) Effects of free fatty acids, growth hormone and growth hormone receptor blockade on serum ghrelin levels in humans. *Clin Endocrinol* 66: 641-645.
- Gosnell BA, Levine AS (2009) Reward systems and food intake: role of opioids. *Int J Obes* 2005 33: S54-S58.
- Granata R, Settanni F, Trovato L, Destefanis S, Gallo D, Martinetti M, Ghigo E, Muccioli G (2006) Unacylated as well as acylated ghrelin promotes cell survival and inhibit apoptosis in HIT-T15 pancreatic beta-cells. *J Endocrinol Invest* 29: RC19-RC22.
- Grey CL, Grayfer L, Belosevic M, Chang JP (2010) Ghrelin stimulation of gonadotropin (LH) release from goldfish pituitary cells: presence of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) and involvement of voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Mol Cell Endocrinol* 317: 64-77.
- Grill HJ, Hayes MR (2009) The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int J Obes* 33: S11-S15.
- Grimm RJ (1960) Feeding behavior and electrical stimulation of the brain of *Carassius auratus*. *Science* 131: 162-163.
- Gualillo O, Caminos J, Blanco M, García-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Diéguez C, Casanueva F (2001) Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 142: 788-794.

- Guan HZ, Li Q-C, Jiang Z-Y (2010) Ghrelin acts on rat dorsal vagal complex to stimulate feeding via arcuate neuropeptide Y/agouti-related peptide neurons activation. *Sheng Li Xue Bao* 62: 357-364.
- Guan JL, Wang QP, Kageyama H, Takenoya F, Kita T, Matsuoka T, Funahashi H, Shioda S (2003) Synaptic interactions between ghrelin- and neuropeptide Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Peptides* 24: 1921-1928.
- Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, van der Ploeg LH, Howard AD (1997) Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 48: 23-29.
- Guerre-Millo M (2008) Adiponectin: an update. *Diabetes Metab* 34: 12-18.
- Gutiérrez JA, Solenberg PJ, Perkins DR, Willency JA, Knierman MD, Jin Z, Witcher DR, Luo S, Onyia JE, Hale JE (2008) Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid transferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 6320-6325.
- Gutiérrez-Ruiz J, Velázquez-Paniagua M, Prieto-Gómez B (2011) El tejido adiposo como órgano maestro en el metabolismo. *Rev Endocrinol Nutr* 19: 154-162.

H

- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP *et al.* (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 1-36.
- Hagemann D, Holst JJ, Gethmann A, Banasch M, Schmidt WE, Meier JJ (2007) Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) suppresses ghrelin levels in humans via increased insulin secretion. *Regul Pept* 143: 64-68.
- Handjieva-Darlenska T, Boyadjieva N (2009) The effect of high-fat diet on plasma ghrelin and leptin levels in rats. *J Physiol Biochem* 65: 157-164.
- Harada N, Inagaki N (2012) Role of sodium-glucose transporters in glucose uptake of the intestine and kidney. *J Diabetes Investig* 3: 352-353.
- Hardie DG (2004) The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* 117: 5479-5487.
- Harrison JL, Miller DW, Findlay PA, Adam CL (2008) Photoperiod influences the central effects of ghrelin on food intake, GH and LH secretion in sheep. *Neuroendocrinology* 87: 182-192.
- Hatef A, Yufa R, Unniappan S (2015) Ghrelin O-acyl transferase in zebrafish is an evolutionarily conserved peptide upregulated during calorie restriction. *Zebrafish* 12: 327-338.

- Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C (2001) GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4284-4291.
- Havel PJ (2001) Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med* 226: 963-977.
- Hayes MR, Mietlicki-Baase EG, Kanoski SE, De Jonghe BC (2014) Incretins and amylin: neuroendocrine communication between the gut, pancreas, and brain in control of food intake and blood glucose. *Annu Rev Nutr* 34: 237-260.
- Heijboer AC, van den Hoek AM, Parlevliet ET, Havekes LM, Romijn JA, Pijl H, Corssmit EPM (2006) Ghrelin differentially affects hepatic and peripheral insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 49: 732-738.
- Herget U, Wolf A, Wullmann MF, Ryu S (2014) Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol* 522: 1542-1564.
- Hevrøy EM, Azpeleta C, Shimizu M, Lanzén A, Kaiya H, Espe M, Olsvik PA (2011) Effects of short-term starvation on ghrelin, GH-IGF system, and IGF-binding proteins in Atlantic salmon. *Fish Physiol Biochem* 37: 217-232.
- Hidalgo M, Urea E, Sanz A (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170: 267-283.
- Holliday ND, Holst B, Rodionova EA, Schwartz TW, Cox HM (2007) Importance of constitutive activity and arrestin-independent mechanisms for intracellular trafficking of the ghrelin receptor. *Mol Endocrinol* 21: 3100-3112.
- Holmes E, Davies I, Lowe G, Ranganath LR (2009) Circulating ghrelin exists in both lipoprotein bound and free forms. *Ann Clin Biochem* 46: 514-516.
- Holmgren S, Olsson C (2009) The neuronal and endocrine regulation of gut function. En: *Fish Neuroendocrinology* (NJ Bernier, G van der Kraak, AP Farrel y CJ Brauner, eds), Academic Press, San Diego, Estados Unidos. pp. 468-512.
- Holst B, Brandt E, Bach A, Heding A, Schwartz TW (2005) Nonpeptide and peptide growth hormone secretagogues act both as ghrelin receptor agonist and as positive or negative allosteric modulators of ghrelin signaling. *Mol Endocrinol* 19: 2400-2411.
- Holtmann G, Talley NJ (2014) The stomach-brain axis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 28: 967-979.
- Horvath TL, Diano S, Sotonyi P, Heiman M, Tschöp M (2001) Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance - a hypothalamic perspective. *Endocrinology* 142: 4163-4169.
- Hosoda H, Kangawa K (2008) The autonomic nervous system regulates gastric ghrelin secretion in rats. *Regul Pept* 146: 12-18.

- Hosoda H, Kojima M, Mizushima T, Shimizu S, Kangawa K (2003) Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 278: 64-70.
- Hou Z, Miao Y, Gao L, Pan H, Zhu S (2006) Ghrelin-containing neuron in cerebral cortex and hypothalamus linked with the DVC of brainstem in rat. *Regul Pept* 134: 126-131.
- Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberator PA, Rosenblum CI, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J *et al.* (1996) A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273: 974-977.
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L *et al.* (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496: 498-503.
- Hussain MA, Song W-J, Wolfe A (2015) There is kisspeptin - and then there is kisspeptin. *Trends Endocrinol Metab TEM* 26: 564-572.

I

- Ida T (2012) Variety of acyl modifications in mammalian ghrelins. *Meth Enzymol* 514: 63-73.
- Ida T, Miyazato M, Naganobu K, Nakahara K, Sato M, Lin X-Z, Kaiya H, Doi K, Noda S, Kubo A, Murakami N, Kangawa K (2007) Purification and characterization of feline ghrelin and its possible role. *Domest Anim Endocrinol* 32: 93-105.
- Inhoff T, Mönnikes H, Noetzel S, Stengel A, Goebel M, Dinh QT, Riedl A, Bannert N, Wisser A-S, Wiedenmann B *et al.* (2008) Desacyl ghrelin inhibits the orexigenic effect of peripherally injected ghrelin in rats. *Peptides* 29: 2159-2168.
- Inhoff T, Wiedenmann B, Klapp BF, Mönnikes H, Kobelt P (2009) Is desacyl ghrelin a modulator of food intake? *Peptides* 30: 991-994.
- Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, Fujimiya M (2004) Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J* 18: 439-456.
- Ishida Y, Sakahara S, Tsutsui C, Kaiya H, Sakata I, Oda SI, Sakai T (2009) Identification of ghrelin in the house musk shrew (*Suncus murinus*): cDNA cloning, peptide purification and tissue distribution. *Peptides* 30: 982-990.
- Isorna E, de Pedro N, Valenciano AI, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ (2017) Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. *J Endocrinol* 232: R141-R159.
- Iwakura H, Ariyasu H, Hosoda H, Yamada G, Hosoda K, Nakao K, Kangawa K, Akamizu T (2011) Oxytocin and dopamine stimulate ghrelin secretion by the ghrelin-producing cell line, MGN3-1 *in vitro*. *Endocrinology* 152: 2619-2625.
- Iwakura H, Kangawa K, Nakao K (2015) The regulation of circulating ghrelin - with recent updates from cell-based assays. *Endocr J* 62: 107-122.

J

- Jager G, Witkamp RF (2014) The endocannabinoid system and appetite: relevance for food reward. *Nutr Res Rev* 27: 172-185.
- Jaworek J, Nawrot-Porabka K, Leja-Szpak A, Konturek SJ (2010) Brain-gut axis in the modulation of pancreatic enzyme secretion. *J Physiol Pharmacol* 61: 523-531.
- Jayaram KC (1999) *The freshwater fishes of the Indian region*. Narendra Publishing House, Delhi, India. 551 pp.
- Jensen J, Conlon JM (1992) Substance-P-related and neurokinin-A-related peptides from the brain of the cod and trout. *Eur J Biochem* 206: 659-664.
- Jhanwar-Uniyal M, Beck B, Jhanwar YS, Burlet C, Leibowitz SF (1993) Neuropeptide Y projection from arcuate nucleus to parvocellular division of paraventricular nucleus: specific relation to the ingestion of carbohydrate. *Brain Res* 631: 97-106.
- Ji W, Ping HC, Wei KJ, Zhang GR, Shi ZC, Yang RB, Zou GW, Wang WM (2015) Ghrelin, neuropeptide Y (NPY) and cholecystokinin (CCK) in blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*): cDNA cloning, tissue distribution and mRNA expression changes responding to fasting and refeeding. *Gen Comp Endocrinol* 223: 108-119.
- Jiang H, Betancourt L, Smith RG (2006) Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1 heterodimers. *Mol Endocrinol* 20: 1772-1785.
- Joly-Amado A, Cansell C, Denis RGP, Delbes A-S, Castel J, Martinez S, Luquet S (2014) The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 28: 725-737.
- Jönsson E (2013) The role of ghrelin in energy balance regulation in fish. *Gen Comp Endocrinol* 187: 79-85.
- Jönsson E, Forsman A, Einarsdottir IE, Kaiya H, Ruohonen K, Björnsson BT (2007) Plasma ghrelin levels in rainbow trout in response to fasting, feeding and food composition, and effects of ghrelin on voluntary food intake. *Comp Biochem Physiol A* 147: 1116-1124.
- Jönsson E, Kaiya H, Björnsson BT (2010) Ghrelin decreases food intake in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the central anorexigenic corticotropin-releasing factor system. *Gen Comp Endocrinol* 166: 39-46.

K

- Kageyama H, Funahashi H, Hirayama M, Takenoya F, Kita T, Kato S, Sakurai J, Lee EY, Inoue S, Date Y, Nakazato M, Kangawa K, Shioda S (2005) Morphological analysis of

- ghrelin and its receptor distribution in the rat pancreas. *Regul Pept* 126: 67-71.
- Kageyama H, Takenoya F, Shiba K, Shioda S (2010) Neuronal circuits involving ghrelin in the hypothalamus-mediated regulation of feeding. *Neuropeptides* 44: 133-138.
- Kah O, Pontet A, Danger JM, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, Calas A (1989) Characterization, cerebral distribution and gonadotropin release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 7: 69-76.
- Kaiya H, Andoh T, Ichikawa T, Amiya N, Matsuda K, Kangawa K, Miyazato M (2013a) Determination of ghrelin structure in the barfin flounder (*Verasper moseri*) and involvement of ingested fatty acids in ghrelin acylation. *Front Endocrinol* 4: 117.
- Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M (2013b) Ghrelin receptors in non-mammalian vertebrates. *Front Endocrinol* 4:81.
- Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M (2013c) What is the general action of ghrelin for vertebrates? - comparisons of ghrelin's effects across vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 181, 187–191.
- Kaiya H, Kangawa K, Miyazato M (2014a) Molecular evolution of GPCRs: Ghrelin/ghrelin receptors. *J Mol Endocrinol* 52: T87-T100.
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Koda A, Yamamoto K, Kitajima Y, Matsumoto M, Minamitake Y, Kikuyama S, Kangawa K (2001) Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem* 276: 40441-40448.
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Moriyama S, Takahashi A, Kawauchi H, Kangawa K (2003a) Peptide purification, complementary deoxyribonucleic acid (DNA) and genomic DNA cloning, and functional characterization of ghrelin in rainbow trout. *Endocrinology* 144: 5215-5226.
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K (2003b) Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. *J Endocrinol* 176: 415-423.
- Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K (2003c) Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B* 135: 421-429.
- Kaiya H, Konno N, Kangawa K, Uchiyama M, Miyazato M (2014b) Identification, tissue distribution and functional characterization of the ghrelin receptor in West African lungfish, *Protopterus annectens*. *Gen Comp Endocrinol* 209: 106-117.
- Kaiya H, Miura T, Matsuda K, Miyazato M, Kangawa K (2010) Two functional growth hormone secretagogue receptor (ghrelin receptor) type 1a and 2a in goldfish, *Carassius auratus*. *Mol Cell Endocrinol* 327: 25-39.
- Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Peter RE, Unniappan S (2008) Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A* 149: 109-128.

- Kaiya H, Mori T, Miyazato M, Kangawa K (2009a) Ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor and its genomic organisation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol A* 153: 438-450.
- Kaiya H, Riley LG, Janzen W, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Kangawa K (2009b) Identification and genomic sequence of a ghrelin receptor (GHS-R)-like receptor in the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci* 26: 330-337.
- Kaiya H, Sakata I, Kojima M, Hosoda H, Sakai T, Kangawa K (2004) Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen Comp Endocrinol* 138: 50-57.
- Kaiya H, Sakata I, Yamamoto K, Koda A, Sakai T, Kangawa K, Kikuyama S (2006) Identification of immunoreactive plasma and stomach ghrelin, and expression of stomach ghrelin mRNA in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol* 148: 236-244.
- Kaiya H, Small BC, Bilodeau AL, Shepherd BS, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K (2005) Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen Comp Endocrinol* 143: 201-210.
- Kaiya H, van der Geyten S, Kojima M, Hosoda H, Kitajima Y, Matsumoto M, Geelissen S, Darras VM, Kangawa K (2002) Chicken ghrelin: purification, cDNA cloning, and biological activity. *Endocrinology* 143: 3454-3463.
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20: 68-100.
- Kalra SP, Sahu A, Dube G, Kalra PS (1991) Effects of various tachykinins on pituitary LH secretion, feeding, and sexual behavior in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 632: 332-338.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Oikawa S (2004a) Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regul Pept* 119: 77-81.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I (2000) Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 141: 4797-4800.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Tatsuguchi A, Sugihara H, Oikawa S, Kineman RD (2004b) The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion: GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content. *Endocrinology* 145: 3731-3738.
- Kang KS, Yahashi S, Matsuda K (2011) Central and peripheral effects of ghrelin on energy balance, food intake and lipid metabolism in teleost fish. *Peptides* 32: 2242-2247.
- Kanoski SE, Fortin SM, Ricks KM, Grill HJ (2013) Ghrelin signaling in the ventral hippocampus stimulates learned and motivational aspects of feeding via PI3K-Akt signaling. *Biol Psychiatry* 73: 915-923.

- Kapica M, Laubitz D, Puzio I, Jankowska A, Zabielski R (2006) The ghrelin pentapeptide inhibits the secretion of pancreatic juice in rats. *J Physiol Pharmacol* 57: 691-700.
- Kapica M, Puzio I, Kato I, Kuwahara A, Zabielski R (2008) Role of feed-regulating peptides on pancreatic exocrine secretion. *J Physiol Pharmacol* 59: 145-159.
- Kaslin J, Nystedt JM, Ostergård M, Peitsaro N, Panula P (2004) The orexin/hypocretin system in zebrafish is connected to the aminergic and cholinergic systems. *J Neurosci* 24: 2678-2689.
- Kawakoshi A, Kaiya H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Miyazato M, Hosoda H, Kangawa K (2007) Identification of a ghrelin-like peptide in two species of shark, *Sphyrna lewini* and *Carcharhinus melanopterus*. *Gen Comp Endocrinol* 151: 259-268.
- Keen-Rhinehart E, Bartness TJ (2004) Peripheral ghrelin injections stimulate food intake, foraging, and food hoarding in Siberian hamsters. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R716-R722.
- Kellokoski E, Pöykkö SM, Karjalainen AH, Ukkola O, Heikkinen J, Kesäniemi YA, Hörkö S (2005) Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2954-2963.
- Kerbel B, Unniappan S (2012) Nesfatin-1 suppresses energy intake, co-localises ghrelin in the brain and gut, and alters ghrelin, cholecystokinin and orexin mRNA expression in goldfish. *J Neuroendocrinol* 24: 366-377.
- Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, Smith RG (2012) Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* 73: 317-332.
- Khandekar N, Berning BA, Sainsbury A, Lin S (2015) The role of pancreatic polypeptide in the regulation of energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 418: 33-41.
- Khatib MN, Gaidhane S, Gaidhane A, Simkhada P, Zahiruddin Q (2015) Ghrelin O acyl transferase (GOAT) as a novel metabolic regulatory enzyme. *J Clin Diagn Res* 9: LE01-LE05.
- Kim KD, Lim SG, Kang YJ, Kim KW, Son MH (2012) Effects of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of juveniles far eastern catfish *Silurus asotus*. *Asian-Australas J Anim Sci* 25: 369-374.
- Kim MS, Yoon CY, Jang PG, Park YJ, Shin CS, Park HS, Ryu JW, Pak YK, Park JY, Lee KU *et al.* (2004) The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18: 2291-2301.
- Kim SW, Her SJ, Park SJ, Kim D, Park KS, Lee HK, Han BH, Kim MS, Shin CS, Kim SY (2005) Ghrelin stimulates proliferation and differentiation and inhibits apoptosis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Bone* 37: 359-369.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203: 253-310.

- King SJ, Isaacs AM, O'Farrell E, Abizaid A (2011) Motivation to obtain preferred foods is enhanced by ghrelin in the ventral tegmental area. *Horm Behav* 60: 572-580.
- Kirchner H, Gutierrez JA, Solenberg PJ, Pfluger PT, Czyzyk TA, Willency JA, Schürmann A, Joost H-G, Jandacek RJ, Hale JE *et al.* (2009) GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med* 15: 741-745.
- Kitazawa T, Itoh K, Yaosaka N, Maruyama K, Matsuda K, Teraoka H, Kaiya H (2012) Ghrelin does not affect gastrointestinal contractility in rainbow trout and goldfish *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 178: 539-545.
- Kitazawa T, Kaiya H, Taneike T (2007) Contractile effects of ghrelin-related peptides on the chicken gastrointestinal tract *in vitro*. *Peptides* 28: 617-624.
- Kitazawa T, Maeda Y, Kaiya H (2009) Molecular cloning of growth hormone secretagogue-receptor and effect of quail ghrelin on gastrointestinal motility in Japanese quail. *Regul Pept* 158: 132-142.
- Kitazawa T, Shimazaki M, Kikuta A, Yaosaka N, Teraoka H, Kaiya H (2016) Effects of ghrelin and motilin on smooth muscle contractility of the isolated gastrointestinal tract from the bullfrog and Japanese fire belly newt. *Gen Comp Endocrinol* 232: 51-59.
- Kluge M, Schüssler P, Uhr M, Yassouridis A, Steiger A (2007) Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3202-3205.
- Knerr I, Gröschl M, Rascher W, Rauh M (2003) Endocrine effects of food intake: insulin, ghrelin, and leptin responses to a single bolus of essential amino acids in humans. *Ann Nutr Metab* 47: 312-318.
- Kobelt P, Tebbe JJ, Tjandra I, Stengel A, Bae HG, Andresen V, van der Voort IR, Veh RW, Werner CR, Klapp BF *et al.* (2005) CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R751-R758.
- Kohno D, Gao H-Z, Muroya S, Kikuyama S, Yada T (2003) Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* 52: 948-956.
- Kohno D, Nakata M, Maekawa F, Fujiwara K, Maejima Y, Kuramochi M, Shimazaki T, Okano H, Onaka T, Yada T (2007) Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology* 148: 2251-2263.
- Kojima K, Amiya N, Kamijo M, Kageyama H, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K (2010) Relationship between alpha-melanocyte-stimulating hormone- and neuropeptide Y-containing neurons in the goldfish hypothalamus. *Gen Comp Endocrinol* 167: 366-372.
- Kojima K, Kamijo M, Kageyama H, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K (2009) Neuronal relationship between orexin-A- and neuropeptide Y-induced orexigenic actions in goldfish. *Neuropeptides* 43: 63-71.

- Kojima M, Hamamoto A, Sato T (2016) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT), a specific enzyme that modifies ghrelin with a medium-chain fatty acid. *J Biochem* 160: 189-194.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.
- Kojima M, Kangawa K (2005) Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 85: 495-522.
- Kola B, Farkas I, Christ-Crain M, Wittmann G, Lolli F, Amin F, Harvey-White J, Liposits Z, Kunos G, Grossman AB *et al.* (2008) The orexigenic effect of ghrelin is mediated through central activation of the endogenous cannabinoid system. *PLoS ONE* 3: e1797.
- Konturek SJ, Konturek JW, Pawlik T, Brzozowski T (2004) Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *J Physiol Pharmacol* 55: 137-154.
- Korbonits M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB (2001) Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. *Endocrine* 14: 101-104.
- Korhonen T, Saarela S (2005) Role of adiposity hormones in the mouse during fasting and winter-acclimatization. *Comp Biochem Physiol A* 140: 217-223.
- Kottelat M, Freyhof J (2007) *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol, Berlín, Alemania. 646 pp.

L

- Lacquaniti A, Donato V, Chirico V, Buemi A, Buemi M (2011) Obestatin: an interesting but controversial gut hormone. *Ann Nutr Metab* 59: 193-199.
- Lanfranco F, Motta G, Baldi M, Gasco V, Grottoli S, Benso A, Broglio F, Ghigo E (2010) Ghrelin and anterior pituitary function. *Front Horm Res* 38: 206-211.
- Larhammar D, Risinger C (1994) Molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol Phylogenet Evol* 3: 59-68.
- Le Foll C, Irani BG, Magnan C, Dunn-Meynell AA, Levin BE (2009) Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R655-R664.
- Leal E, Fernández-Durán B, Agulleiro MJ, Conde-Siera M, Míguez JM, Cerdá-Reverter JM (2013) Effects of dopaminergic system activation on feeding behavior and growth performance of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): a self-feeding approach. *Horm Behav* 64: 113-121.
- Lear PV, Iglesias MJ, Feijóo-Bandín S, Rodríguez-Penas D, Mosquera-Leal A, García-Rúa V, Gualillo O, Ghè C, Arnoletti E, Muccioli G *et al.* (2010) Des-acyl ghrelin has specific binding sites and different metabolic effects from ghrelin in cardiomyocytes. *Endocrinology* 151: 3286-3298.
- Lenard NR, Berthoud H-R (2008) Central and peripheral regulation of food intake and physical activity: pathways and genes. *Obes (Silver Spring)* 16: S11-S22.

- Leung PK, Chow KBS, Lau PN, Chu KM, Chan CB, Cheng CHK, Wise H (2007) The truncated ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) acts as a dominant-negative mutant of the ghrelin receptor. *Cell Signal* 19: 1011-1022.
- Levitas-Djerbi T, Yelin-Bekerman L, Lerer-Goldshtein T, Appelbaum L (2015) Hypothalamic leptin-neurotensin-hypocretin neuronal networks in zebrafish. *J Comp Neurol* 523: 831-848.
- Li E, Chung H, Kim Y, Kim DH, Ryu JH, Sato T, Kojima M, Park S (2013) Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory. *Endocr J* 60: 781-789.
- Li L, Zhang LK, Pang YZ, Pan CS, Qi YF, Chen L, Wang X, Tang CS, Zhang J (2006) Cardioprotective effects of ghrelin and des-octanoyl ghrelin on myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Acta Pharmacol Sin* 27: 527-535.
- Li Z, Xu G, Qin Y, Zhang C, Tang H, Yin Y, Xiang X, Li Y, Zhao J, Mulholland M, Zhang W (2014) Ghrelin promotes hepatic lipogenesis by activation of mTOR-PPAR signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 13163-13168.
- Lian A, Wu K, Liu T, Jiang N, Jiang Q (2016) Adropin induction of lipoprotein lipase expression in tilapia hepatocytes. *J Mol Endocrinol* 56: 11-22.
- Librán-Pérez M, Polakof S, López-Patiño MA, Míguez JM, Soengas JL (2012) Evidence of a metabolic fatty acid-sensing system in the hypothalamus and Brockmann bodies of rainbow trout: implications in food intake regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R1340-R1350.
- Lilleness BM, Frishman WH (2016) Ghrelin and the cardiovascular system. *Cardiol Rev* 24: 288-297.
- Lim CT, Kola B, Grossman A, Korbonits M (2011) The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocr J* 58: 707-710.
- Lin C-Y, Chiang C-Y, Tsai H-J (2016) Zebrafish and medaka: new model organisms for modern biomedical research. *J Biomed Sci* 23: 19.
- Lin L, Sun Y (2012) Thermogenic characterization of ghrelin receptor null mice. *Methods Enzymol* 514: 355-370.
- Lin X, Volkoff H, Narnaware Y, Bernier NJ, Peyon P, Peter RE (2000) Brain regulation of feeding behavior and food intake in fish. *Comp Biochem Physiol A* 126: 415-434.
- Lin XW, Peter RE (1997) Goldfish gamma-preprotachykinin mRNA encodes the neuropeptides substance P, carassin, and neurokinin A. *Peptides* 18: 817-824.
- Lippl F, Erdmann J, Atmatzidis S, Schusdziarra V (2005) Direct effect of leptin on gastric ghrelin secretion. *Horm Metab Res* 37: 123-125.
- Liu FY, Zhang MM, Zeng P, Liu WW, Wang JL, Yang B, Dai Q, Wei J (2016) Study on the molecular mechanism of antinociception induced by ghrelin in acute pain in mice. *Peptides* 83: 1-7.

- Loh K, Herzog H, Shi Y-C (2015) Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol Metab* 26: 125-135.
- Löhr H, Hammerschmidt M (2011) Zebrafish in endocrine systems: recent advances and implications for human disease. *Annu Rev Physiol* 73: 183-211.
- Londrville RL, Duvall CS (2002) Murine leptin injections increase intracellular fatty acid-binding protein in green sunfish (*Lepomis cyanellus*). *Gen Comp Endocrinol* 129: 56-62.
- Londrville RL, Macotela Y, Duff RJ, Easterling MR, Liu Q, Crespi EJ (2014) Comparative endocrinology of leptin: assessing function in a phylogenetic context. *Gen Comp Endocrinol* 203: 146-157.
- Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Qi Y, DiStefano PS, Geddes BJ (2008) Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regul Pept* 150: 55-61.
- Lu S, Guan JL, Wang QP, Uehara K, Yamada S, Goto N, Date Y, Nakazato M, Kojima M, Kangawa K, Shioda S (2002) Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 321: 157-160.

M

- Ma J, Yu Y, Xue J, Ou C, Mo H, Liu X (2015) Tissue distribution and developmental changes of ghrelin and GOAT expression in broiler chickens during embryogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 213: 130-135.
- Maejima Y, Kohno D, Iwasaki Y, Yada T (2011) Insulin suppresses ghrelin-induced calcium signaling in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Aging* 3: 1092-1097.
- Magliulo-Cepriano L, Schreibman MP, Blüm V (1993) The distribution of immunoreactive FMRF-amide, neurotensin, and galanin in the brain and pituitary gland of three species of Xiphophorus from birth to sexual maturity. *Gen Comp Endocrinol* 92: 269-280.
- Magni P, Dozio E, Ruscica M, Celotti F, Masini MA, Prato P, Broccoli M, Mambro A, Morè M, Strollo F (2009) Feeding behavior in mammals including humans. *Ann N Y Acad Sci* 1163: 221-232.
- Majdic G (2009) Integrative role of brain and hypothalamus in the control of energy balance. *Acta Chim Slov* 56: 289-296.
- Manning AJ, Murray HM, Gallant JW, Matsuoka MP, Radford E, Douglas SE (2008) Ontogenetic and tissue-specific expression of preproghrelin in the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *J Endocrinol* 196: 181-192.
- Mano-Otagiri A, Ohata H, Iwasaki-Sekino A, Nemoto T, Shibasaki T (2009) Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J Endocrinol* 201: 341-349.

- Marcano Y, Torcat J, Ayala L, Verdi B, Lairer C, Maldonado M, de Vegas J (2006) Funciones endocrinas del tejido adiposo. *Rev Venez Endocrinol Metab* 4: 15-21.
- Mason BL, Wang Q, Zigman JM (2014) The central nervous system sites mediating the orexigenic actions of ghrelin. *Annu Rev Physiol* 76: 519-533.
- Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K (2000) Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 905-908.
- Matsuda K (2009) Recent advances in the regulation of feeding behavior by neuropeptides in fish. *Ann N Y Acad Sci* 1163: 241-250.
- Matsuda K, Maruyama K, Nakamachi T, Miura T, Shioda S (2006a) Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide on food intake and locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Ann N Y Acad Sci* 1070: 417-421.
- Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Shimakura S-I, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S (2006b) Regulation of food intake by acyl and des-acyl ghrelins in the goldfish. *Peptides* 27: 2321-2325.
- Matsuda K, Miura T, Kaiya H, Maruyama K, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S (2006c) Stimulatory effect of n-octanoylated ghrelin on locomotor activity in the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* 27: 1335-1340.
- Matsuda K, Shimakura SI, Miura T, Maruyama K, Uchiyama M, Kawauchi H, Shioda S, Takahashi A (2007) Feeding-induced changes of melanin-concentrating hormone (MCH)-like immunoreactivity in goldfish brain. *Cell Tissue Res* 328: 375-382.
- Matsuura T, Ross AC (1993) Regulation of hepatic lecithin: retinol acyltransferase activity by retinoic acid. *Arch Biochem Biophys* 301: 221-227.
- Mazzocchi G, Neri G, Rucinski M, Rebuffat P, Spinazzi R, Malendowicz LK, Nussdorfer GG (2004) Ghrelin enhances the growth of cultured human adrenal zona glomerulosa cells by exerting MAPK-mediated proliferogenic and antiapoptotic effects. *Peptides* 25: 1269-1277.
- McCowen KC, Maykel JA, Bistran BR, Ling PR (2002) Circulating ghrelin concentrations are lowered by intravenous glucose or hyperinsulinemic euglycemic conditions in rodents. *J Endocrinol* 175: R7-R11.
- McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, van der Ploeg LH, Howard AD (1997) Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 11: 415-423.
- McVay JA, Kaan HW (1940) The digestive tract of *Carassius auratus*. *Biol Bull* 78: 53.
- Mensah ET, Blanco AM, Donini A, Unniappan S (2017) Brain and intestinal expression of galanin-like peptide (GALP), galanin receptor R1 and galanin receptor R2, and GALP regulation of food intake in goldfish (*Carassius auratus*). *Neurosci Lett* 637: 126-135.

- Menzies JRW, Skibicka KP, Leng G, Dickson SL (2013) Ghrelin, reward and motivation. En: *The ghrelin system. Vol. 25 Endocrine Development* (A Benso, FF Casanueva, E Ghigo y R Granata, eds), Karger AG, Basilea, Suiza. pp. 101-111.
- Merkestein M, Brans MAD, Luijendijk MCM, de Jong JW, Egecioglu E, Dickson SL, Adan RAH (2012) Ghrelin mediates anticipation to a palatable meal in rats. *Obes (Silver Spring)* 20: 963-971.
- Meyer A, Scharl M (1999) Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr Opin Cell Biol* 11: 699-704.
- Mietlicki-Baase EG, Hayes MR (2014) Amylin activates distributed CNS nuclei to control energy balance. *Physiol Behav* 136: 39-46.
- Mihalache L, Gherasim A, Niță O, Ungureanu MC, Pădureanu SS, Gavril RS, Arhire LI (2016) Effects of ghrelin in energy balance and body weight homeostasis. *Hormones (Athens)* 15: 186-196.
- Miura T, Maruyama K, Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Uchiyama M, Shioda S, Matsuda K (2009) Purification and properties of ghrelin from the intestine of the goldfish, *Carassius auratus*. *Peptides* 30: 758-765.
- Miura T, Maruyama K, Shimakura S-I, Kaiya H, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S, Matsuda K (2006) Neuropeptide Y mediates ghrelin-induced feeding in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci Lett* 407: 279-283.
- Miura T, Maruyama K, Shimakura S-I, Kaiya H, Uchiyama M, Kangawa K, Shioda S, Matsuda K (2007) Regulation of food intake in the goldfish by interaction between ghrelin and orexin. *Peptides* 28: 1207-1213.
- Mizutani M, Atsuchi K, Asakawa A, Matsuda N, Fujimura M, Inui A, Kato I, Fujimiya M (2009) Localization of acyl ghrelin- and des-acyl ghrelin-immunoreactive cells in the rat stomach and their responses to intragastric pH. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G974-G980.
- Moesgaard SG, Åhrén B, Carr RD, Gram DX, Brand CL, Sundler F (2004) Effects of high-fat feeding and fasting on ghrelin expression in the mouse stomach. *Regul Pept* 120: 261-267.
- Mohan H, Unniappan S (2013) Discovery of ghrelin o-acyltransferase. *Endocr Dev* 25: 16-24.
- Moon M, Kim HG, Hwang L, Seo JH, Kim S, Hwang S, Kim S, Lee D, Chung H, Oh MS *et al.* (2009) Neuroprotective effect of ghrelin in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation. *Neurotox Res* 15: 332-347.
- Moran-Ramos S, Tovar AR, Torres N (2012) Diet: friend or foe of enteroendocrine cells--how it interacts with enteroendocrine cells. *Adv Nutr* 3: 8-20.
- Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, Hosoda K, Ariyasu H, Yahata K, Mukoyama M, Sugawara A, Hosoda H, Kojima M *et al.* (2000) Kidney produces a novel acylated

- peptide, ghrelin. *FEBS Lett* 486: 213-216.
- Mori M, Suzuki H, Masaoka T, Imaeda H, Nomoto Y, Hosoda H, Nishizawa T, Kangawa K, Hibi T (2007) Intravenous ghrelin administration enhances gastric acid secretion - evaluation using wireless pH capsule: role of ghrelin in gastric acid secretion. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 96-103.
- Morita Y, Finger TE (1985) Topographic and laminar organization of the vagal gustatory system in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Comp Neurol* 238: 187-201.
- Morita Y, Murakami T, Ito H (1983) Cytoarchitecture and topographic projections of the gustatory centers in a teleost, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol* 218: 378-394.
- Moriyama S, Kasahara M, Amiya N, Takahashi A, Amano M, Sower SA, Yamamori K, Kawauchi H (2007) RFamide peptides inhibit the expression of melanotropin and growth hormone genes in the pituitary of an Agnathan, the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Endocrinology* 148: 3740-3749.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289-295.
- Morton GJ, Meek TH & Schwartz MW (2014) Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 15: 367-378.
- Muccioli G, Lorenzi T, Lorenzi M, Ghè C, Arnoletti E, Raso GM, Castellucci M, Gualillo O, Meli R (2011) Beyond the metabolic role of ghrelin: A new player in the regulation of reproductive function. *Peptides* 32: 2514-2521.
- Mueckler M (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219: 713-725.
- Müller TD, Nogueiras R, Andermann ML, Andrews, ZB, Anker SD, Argente J, Batterham RL, Benoit SC, Bowers CY, Broglio F *et al.* (2015) Ghrelin. *Mol Metab* 4: 437-460.
- Mundinger TO, Cummings DE, Taborsky GJ (2006) Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. *Endocrinology* 147: 2893-2901.
- Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K (2002) Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 277: 5667-5674.
- Musson MC, Jepeal LI, Finnerty JR, Wolfe MM (2011) Evolutionary expression of glucose-dependent-insulinotropic polypeptide (GIP). *Regul Pept* 171: 26-34.
- Muus BJ, Dahlström P (1981) *Los peces de agua dulce de España y Europa: pesca, biología, importancia económica*. Omega, Barcelona, España. 232 pp.

N

- Nakamachi T, Matsuda K, Maruyama K, Miura T, Uchiyama M, Funahashi H, Sakurai T, Shioda S (2006) Regulation by orexin of feeding behaviour and locomotor activity in the goldfish. *J Neuroendocrinol* 18: 290-297.

- Naleid AM, Grace MK, Cummings DE, Levine AS (2005) Ghrelin induces feeding in the mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens. *Peptides* 26: 2274-2279.
- Narnaware YK, Peter RE (2002) Influence of diet composition on food intake and neuropeptide Y (NPY) gene expression in goldfish brain. *Regul Pept* 103: 75-83.
- Näslund E, Hellström PM (2007) Appetite signaling: from gut peptides and enteric nerves to brain. *Physiol Behav* 92: 256-262.
- Nass R, Nikolayev A, Liu J, Pezzoli SS, Farhy LS, Patrie J, Gaylinn BD, Heiman M, Thorner MO (2015) The level of circulating octanoate does not predict ghrelin O-acyl transferase (GOAT)-mediated acylation of ghrelin during fasting. *J Clin Endocrinol Metab* 100: E110-E113.
- Nawrot-Porabka K, Jaworek J, Leja-Szpak A, Szklarczyk J, Macko M, Kot M, Mitis-Musiol M, Konturek SJ, Pawlik WW (2007) The effect of luminal ghrelin on pancreatic enzyme secretion in the rat. *Regul Pept* 143: 56-63.
- Neary NM, Druce MR, Small CJ, Bloom SR (2006) Acylated ghrelin stimulates food intake in the fed and fasted states but desacylated ghrelin has no effect. *Gut* 55: 135.
- Nelson LE, Sheridan MA (2006) Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish. *Gen Comp Endocrinol* 148: 116-124.
- Nie Q, Zeng H, Lei M, Ishag NA, Fang M, Sun B, Yang G, Zhang X (2004) Genomic organisation of the chicken ghrelin gene and its single nucleotide polymorphisms detected by denaturing high-performance liquid chromatography. *Br Poult Sci* 45: 611-618.
- Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E (2014a) Crosstalking between the “gut-brain” hormone ghrelin and the circadian system in the goldfish. Effects on clock gene expression and food anticipatory activity. *Gen Comp Endocrinol* 205: 287-295.
- Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Sánchez-Bretaña A, Isorna E (2014b) Orexin as an input of circadian system in goldfish: effects on clock gene expression and locomotor activity rhythms. *Peptides* 52: 29-37.
- Nisembaum LG, Velarde E, Tinoco AB, Azpeleta C, de Pedro N, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Isorna E (2012) Light-dark cycle and feeding time differentially entrains the gut molecular clock of the goldfish (*Carassius auratus*). *Chronobiol Int* 29: 665-673.
- Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Kaiya H, Mori K, Fukue Y, Yanase T, Nawata H, Kangawa K, Kojima M (2005) Ingested medium-chain fatty acids are directly utilized for the acyl modification of ghrelin. *Endocrinology* 146: 2255-2264.
- Nishi Y, Yoh J, Hiejima H, Kojima M (2011) Structures and molecular forms of the ghrelin-family peptides. *Peptides* 32: 2175-2182.
- Nzohabonayo E, Kassam D, Kang'ombe J (2017) Effect of lipid levels on reproductive performance of *Oreochromis karongae*. *Aquac Res* doi: 10.1111/are.13258.

O

- O'Brien M, Earley P, Morrison JJ, Smith TJ (2010) Ghrelin in the human myometrium. *Reprod Biol Endocrinol* 8: 55.
- Ohgusu H, Shirouzu K, Nakamura Y, Nakashima Y, Ida T, Sato T, Kojima M (2009) Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) has a preference for n-hexanoyl-CoA over n-octanoyl-CoA as an acyl donor. *Biochem Biophys Res Commun* 386: 153-158.
- Olsson C, Holbrook JD, Bompadre G, Jönsson E, Hoyle CHV, Sanger GJ, Holmgren S, Andrews PLR (2008) Identification of genes for the ghrelin and motilin receptors and a novel related gene in fish, and stimulation of intestinal motility in zebrafish (*Danio rerio*) by ghrelin and motilin. *Gen Comp Endocrinol* 155: 217-226.
- Olszewski PK, Alsiö J, Schiöth HB, Levine AS (2011) Opioids as facilitators of feeding: can any food be rewarding? *Physiol Behav* 104: 105-110.
- Osterstock G, Escobar P, Mitutsova V, Gouty-Colomer L-A, Fontanaud P, Molino F, Fehrentz J-A, Carmignac D, Martínez J, Guerineau NC *et al.* (2010) Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate nucleus. *PLoS ONE* 5: e9159.
- Otis JP, Zeituni EM, Thierer JH, Anderson JL, Brown AC, Boehm ED, Cerchione DM, Ceasrine AM, Avraham-Davidi I, Tempelhof H *et al.* (2015) Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake. *Dis Model Mech* 8: 295-309.
- Otto-Buczkowska E, Chobot A (2012) Role of ghrelin and leptin in the regulation of carbohydrate metabolism. Part I. Ghrelin. *Postepy Hig Med Dosw* 66: 795-798.
- Overduin J, Frayo RS, Grill HJ, Kaplan JM, Cummings DE (2005) Role of the duodenum and macronutrient type in ghrelin regulation. *Endocrinology* 146: 845-850.

P

- Pagotto U, Gambineri A, Pelusi C, Genghini S, Cacciari M, Otto B, Castañeda T, Tschöp M, Pasquali R (2003) Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4139-4143.
- Palou A, Bonet ML, Picó C, Rodríguez AM (2004) Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra* 48: 36-48.
- Pan W, Kastin AJ (2008) Urocortin and the brain. *Prog Neurobiol* 84: 148-156.
- Pandolfi M, Cánepa MM, Ravaglia MA, Maggese MC, Paz DA, Vissio PG (2003) Melanin-concentrating hormone system in the brain and skin of the cichlid fish *Cichlasoma*

- dimerus*: anatomical localization, ontogeny and distribution in comparison to alpha-melanocyte-stimulating hormone-expressing cells. *Cell Tissue Res* 311: 61-69.
- Pankhurst NW, King HR, Ludke SL (2008) Relationship between stress, feeding and plasma ghrelin levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mar Freshw Behav Physiol* 41: 53-64.
- Panula P (2010) Hypocretin/orexin in fish physiology with emphasis on zebrafish. *Acta Physiol (Oxf)* 198: 381-386.
- Parhar IS, Sato H, Sakuma Y (2003) Ghrelin gene in cichlid fish is modulated by sex and development. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 169-175.
- Park JM, Kakimoto T, Kuroki T, Shiraishi R, Fujise T, Iwakiri R, Fujimoto K (2008) Suppression of intestinal mucosal apoptosis by ghrelin in fasting rats. *Exp Biol Med* 233: 48-56.
- Park S, Sohn S, Kineman RD (2004) Fasting-induced changes in the hypothalamic-pituitary-GH axis in the absence of GH expression: lessons from the spontaneous dwarf rat. *J Endocrinol* 180: 369-378.
- Parker HE, Gribble FM, Reimann F (2014) The role of gut endocrine cells in control of metabolism and appetite. *Exp Physiol* 99: 1116-1120.
- Patel AD, Stanley SA, Murphy KG, Frost GS, Gardiner JV, Kent AS, White NE, Ghattei MA, Bloom SR (2006) Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regul Pept* 134: 17-22.
- Patterson M, Murphy KG, le Roux CW, Ghattei MA, Bloom SR (2005) Characterization of ghrelin-like immunoreactivity in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2205-2211.
- Paulino G, Barbier de la Serre C, Knotts TA, Oort PJ, Newman JW, Adams SH, Raybould HE (2009) Increased expression of receptors for orexigenic factors in nodose ganglion of diet-induced obese rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E898-903.
- Peciña S, Smith KS (2010) Hedonic and motivational roles of opioids in food reward: implications for overeating disorders. *Pharmacol Biochem Behav* 97: 34-46.
- Peddu SC, Breves JP, Kaiya H, Gordon Grau E, Riley Jr LG (2009) Pre- and postprandial effects on ghrelin signaling in the brain and on the GH/IGF-I axis in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen Comp Endocrinol* 161: 412-418.
- Peeters TL (2005) Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut* 54: 1638-1649.
- Peng C, Gallin W, Peter RE, Blomqvist AG, Larhammar D (1994) Neuropeptide-Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology* 134: 1095-1103.
- Perez-Tilve D, Heppner K, Kirchner H, Lockie SH, Woods SC, Smiley DL, Tschöp M, Pfluger P (2011) Ghrelin-induced adiposity is independent of orexigenic effects. *FASEB J* 25: 2814-2822.

- Perez-Tilve D, Hofmann SM, Basford J, Nogueiras R, Pfluger PT, Patterson JT, Grant E, Wilson-Perez HE, Granholm NA, Arnold M *et al.* (2010) Melanocortin signaling in the CNS directly regulates circulating cholesterol. *Nat Neurosci* 13: 877-882.
- Peter RE (1979) The brain and feeding behavior. En: *Fish physiology*, Vol VIII (WS Hoar, DJ Randall y JR Brett, eds), Academic Press, Nueva York, Estados Unidos. pp. 121-159.
- Petersenn S, Rasch AC, Penshorn M, Beil FU, Schulte HM (2001) Genomic structure and transcriptional regulation of the human growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 142: 2649-2659.
- Piccinetti CC, Migliarini B, Petrosino S, Di Marzo V, Carnevali O (2010) Anandamide and AM251, via water, modulate food intake at central and peripheral level in fish. *Gen Comp Endocrinol* 166: 259-267.
- Pickavance LC, Staines WA, Fryer JN (1992) Distributions and colocalization of neuropeptide Y and somatostatin in the goldfish brain. *J Chem Neuroanat* 5: 221-233.
- Polakof S, Alvarez R, Soengas JL (2010) Gut glucose metabolism in rainbow trout: implications in glucose homeostasis and glucosensing capacity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299: R19-R32.
- Polakof S, Míguez JM, Soengas JL (2011) Ghrelin effects on central glucosensing and energy homeostasis-related peptides in rainbow trout. *Domest Anim Endocrinol* 41: 126-136.
- Polakof S, Soengas JL (2013) Evidence of sugar sensitive genes in the gut of a carnivorous fish species. *Comp Biochem Physiol B* 166: 58-64.
- Popovic V, Miljic D, Micic D, Damjanovic S, Arvat E, Ghigo E, Diéguez C, Casanueva FF (2003) Ghrelin main action on the regulation of growth hormone release is exerted at hypothalamic level. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 3450-3453.
- Porporato PE, Filigheddu N, Reano S, Ferrara M, Angelino E, Gnocchi VF, Prodam F, Ronchi G, Fagoonee S, Fornaro M *et al.* (2013) Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice. *J Clin Invest* 123: 611-622.
- Porte D, Baskin DG, Schwartz MW (2002) Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev* 60: S20-S29.
- Porter DT (2015) Distribution and female reproductive state differences in orexigenic and anorexigenic neurons in the brain of the mouthbrooding African cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. Tesis Doctoral.

R

- Rasoamanana R, Darcel N, Fromentin G, Tomé D (2012) Nutrient sensing and signalling by the gut. *Proc Nutr Soc* 71: 446-455.
- Ratner C, Skov LJ, Raida Z, Bächler T, Bellmann-Sickert K, Le Foll C, Sivertsen B,

- Dalbøge LS, Hartmann B, Beck-Sickinger AG *et al.* (2016) Effects of peripheral neurotensin on appetite regulation and its role in gastric bypass surgery. *Endocrinology* 157: 3482-3492.
- Rediger A, Tarnow P, Bickenbach A, Schaefer M, Krude H, Gruters A, Biebermann H (2009) Heterodimerization of hypothalamic G-protein-coupled receptors involved in weight regulation. *Obes Facts* 2: 80-86.
- Reimer MK, Pacini G, Ahrén B (2003) Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology* 144: 916-921.
- Reynolds CB, Elias AN, Whisnant CS (2010) Effects of feeding pattern on ghrelin and insulin secretion in pigs. *Domest Anim Endocrinol* 39: 90-96.
- Richards MP, Poch SM, McMurtry JP (2006) Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *Gen Comp Endocrinol* 145: 298-310.
- Riediger T, Bothe C, Becskei C, Lutz TA (2004) Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology* 79: 317-326.
- Riley LG, Fox BK, Breves JP, Kaiya H, Dorough CP, Hirano T, Grau EG (2008) Absence of effects of short-term fasting on plasma ghrelin and brain expression of ghrelin receptors in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci* 25: 821-827.
- Riley LG, Fox BK, Kaiya H, Hirano T, Grau EG (2005) Long-term treatment of ghrelin stimulates feeding, fat deposition, and alters the GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol* 142: 234-240.
- Riley LG, Hirano T, Grau EG (2002) Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci* 19: 797-800.
- Riley LG, Walker AP, Dorough CP, Schwandt SE, Grau EG (2009) Glucose regulates ghrelin, neuropeptide Y, and the GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol A* 154: 541-546.
- Rindi G, Necchi V, Savio A, Torsello A, Zoli M, Locatelli V, Raimondo F, Cocchi D, Solcia E (2002) Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues. *Histochem Cell Biol* 117: 511-519.
- Rink E, Wullimann MF (1998) Some forebrain connections of the gustatory system in the goldfish *Carassius auratus* visualized by separate DiI application to the hypothalamic inferior lobe and the torus lateralis. *J Comp Neurol* 394: 152-170.
- Rizzo M, Rizvi AA, Sudar E, Soskic S, Obradovic M, Montalto G, Boutjdir M, Mikhailidis DP, Isenovic ER (2013) A review of the cardiovascular and anti-atherogenic effects of ghrelin. *Curr Pharm Des* 19: 4953-4963.
- Roberts MG, Savage GE (1978) Effects of hypothalamic lesions on the food intake of the goldfish (*Carassius auratus*). *Brain Behav Evol* 15: 150-164.
- Röder PV, Geillinger KE, Zietek TS, Thorens B, Koepsell H, Daniel H (2014) The role of

- SGLT1 and GLUT2 in intestinal glucose transport and sensing. *PLoS ONE* 9: e89977.
- Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Gil MJ, Becerril S, Sáinz N, Silva C, Salvador J, Colina I, Frühbeck G (2009) Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes* 33: 541-552.
- Rojas-García CR, Rønnestad (2002) Cholecystokinin and tryptic activity in the gut and body of developing Atlantic halibut larvae: evidence for participation in the regulation of protein digestion. *J Fish Biol* 61: 973-986.
- Romero A, Kirchner H, Heppner K, Pfluger PT, Tschop MH, Nogueiras R (2010) GOAT: the master switch for the ghrelin system? *Eur J Endocrinol* 163: 1-8.
- Rucinski M, Ziolkowska A, Szyszka M, Hochol A, Malendowicz LK (2012) Evidence suggesting that ghrelin O-acyl transferase inhibitor acts at the hypothalamus to inhibit hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis function in the rat. *Peptides* 35: 149-159.

S

- Sahu A (2003) Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol* 24: 225-253.
- Sahu A, Carraway RE, Wang YP (2001) Evidence that neurotensin mediates the central effect of leptin on food intake in rat. *Brain Res* 888: 343-347.
- Sahu A, Kalra PS, Dube MG, Kalra SP (1988) Neuropeptide K suppresses feeding in the rat. *Regul Pept* 23: 135-143.
- Saito E, Kaiya H, Takagi T, Yamasaki I, Denbow DM, Kangawa K, Furuse M (2002) Chicken ghrelin and growth hormone-releasing peptide-2 inhibit food intake of neonatal chicks. *Eur J Pharmacol* 453: 75-79.
- Sakata I, Mori T, Kaiya H, Yamazaki M, Kangawa K, Inoue K, Sakai T (2004) Localization of ghrelin-producing cells in the stomach of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Zoolog Sci* 21: 757-762.
- Sakata I, Yang J, Lee CE, Osborne-Lawrence S, Rovinsky SA, Elmquist JK, Zigman JM (2009) Colocalization of ghrelin O-acyltransferase and ghrelin in gastric mucosal cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E134-E141.
- Sakurada T, Ro S, Onouchi T, Ohno S, Aoyama T, Chinen K, Takabayashi H, Kato S, Takayama K, Yakabi K (2010) Comparison of the actions of acylated and desacylated ghrelin on acid secretion in the rat stomach. *J Gastroenterol* 45: 1111-1120.
- Salehi A, Dornonville de la Cour C, Håkanson R, Lundquist I (2004) Effects of ghrelin on insulin and glucagon secretion: a study of isolated pancreatic islets and intact mice. *Regul Pept* 118: 143-150.
- Salmerón C, Johansson M, Asaad M, Angotzi AR, Rønnestad I, Stefansson SO, Jönsson E, Björnsson BT, Gutiérrez J, Navarro I, Capilla E (2015) Roles of leptin and ghrelin in

- adipogenesis and lipid metabolism of rainbow trout adipocytes *in vitro*. *Comp Biochem Physiol A* 188: 40-48.
- Sam AH, Troke RC, Tan TM, Bewick GA (2012) The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 63: 46-56.
- Sánchez-Bretaña A, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Isorna E (2015a) The liver of goldfish as a component of the circadian system: integrating a network of signals. *Gen Comp Endocrinol* 221: 213-216.
- Sánchez-Bretaña A, Blanco AM, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Kah O, Isorna E (2017) Ghrelin induces clock genes expression in the liver of goldfish (*Carassius auratus*) via protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Exp Biol* pii: jeb.144253.
- Sánchez-Bretaña A, Blanco AM, Unniappan S, Kah O, Gueguen M-M, Bertucci JI, Alonso-Gómez AL, Valenciano AI, Isorna E, Delgado MJ (2015b) *In situ* localization and rhythmic expression of *ghrelin* and *ghs-rl* ghrelin receptor in the brain and gastrointestinal tract of goldfish (*Carassius auratus*). *PLoS ONE* 10: e0141043.
- Sánchez-Bretaña A, Callejo M, Montero M, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Isorna E (2016) Performing a hepatic timing signal: glucocorticoids induce *gper1a* and *gper1b* expression and repress *gclock1a* and *gbmall1a* in the liver of goldfish. *J Comp Physiol B* 186: 73-82.
- Sánchez-Gurmaches J, Cruz-García L, Gutiérrez J, Navarro I (2012) Adiponectin effects and gene expression in rainbow trout: an *in vivo* and *in vitro* approach. *J Exp Biol* 215: 1373-1383.
- Sánchez-Vázquez FJ, Yamamoto T, Akiyama T, Madrid JA, Tabata M (1998) Selection of macronutrients by goldfish operating self-feeders. *Physiol Behav* 65: 211-218.
- Sarbahi DS (1951) Studies of the digestive tracts and the digestive enzymes of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus) and the largemouth black bass, *Micropterus salmoides* (Lacépède). *Biol Bull* 100: 244-257.
- Sato N, Kanai S, Takano S, Kurosawa M, Funakoshi A, Miyasaka K (2003) Central administration of ghrelin stimulates pancreatic exocrine secretion via the vagus in conscious rats. *Jpn J Physiol* 53: 443-449.
- Sato T, Fukue Y, Teranishi H, Yoshida Y, Kojima M (2005) Molecular forms of hypothalamic ghrelin and its regulation by fasting and 2-deoxy-D-glucose administration. *Endocrinology* 146: 2510-2516.
- Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M (2012) Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem* 151: 119-128.
- Satou M, Kaiya H, Nishi Y, Shinohara A, Kawada S, Miyazato M, Kangawa K, Sugimoto H (2016) Mole ghrelin: cDNA cloning, gene expression, and diverse molecular forms in *Mogera imaizumii*. *Gen Comp Endocrinol* 232: 199-210.
- Satou M, Nakamura Y, Ando H, Sugimoto H (2011) Understanding the functional significance of ghrelin processing and degradation. *Peptides* 32: 2183-2190.

- Satou M, Sugimoto H (2012) The study of ghrelin deacylation enzymes. *Methods Enzymol* 514: 165-179.
- Sawada K, Ukena K, Satake H, Iwakoshi E, Minakata H, Tsutsui K (2002) Novel fish hypothalamic neuropeptide. *Eur J Biochem* 269: 6000-6008.
- Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF (2013a) Taking two to tango: a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward. *Front Neurosci* 7: 148.
- Schellekens H, van Oeffelen WEPA, Dinan TG, Cryan JF (2013b) Promiscuous dimerization of the growth hormone secretagogue receptor (GHS-R1a) attenuates ghrelin-mediated signaling. *J Biol Chem* 288: 181-191.
- Schilling T (2002) The morphology of larval and adult zebrafish. En: *Zebrafish*. (C Nüsslein-Volhard y R Dahm, eds), Oxford University Press, Oxford. pp. 59-94.
- Schusdziarra V, Zimmermann J-P, Erdmann J, Bader U, Schick RR (2008) Differential inhibition of galanin- and ghrelin-induced food intake by i.c.v. GLP-1(7-36)-amide. *Regul Pept* 147: 29-32.
- Schwandt SE, Peddu SC, Riley LG (2010) Differential roles for octanoylated and decanoylated ghrelins in regulating appetite and metabolism. *Int J Pept* 2010: 1-6.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.
- Seoane LM, Al-Massadi O, Barreiro F, Diéguez C, Casanueva FF (2007) Growth hormone and somatostatin directly inhibit gastric ghrelin secretion. An *in vitro* organ culture system. *J Endocrinol Invest* 30: RC22-25.
- Seoane LM, López M, Tovar S, Casanueva FF, Señarís R, Diéguez C (2003) Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 144: 544-551.
- Shah M, Vella A (2014) Effects of GLP-1 on appetite and weight. *Rev Endocr Metab Disord* 15: 181-187.
- Shepherd BS, Johnson JK, Silverstein JT, Parhar IS, Vijayan MM, McGuire A, Weber GM (2007) Endocrine and orexigenic actions of growth hormone secretagogues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol A* 146: 390-399.
- Shepperd E, Peng C, Unniappan S (2012) Ghrelinergic system in fish ovaries and ghrelin inhibition of germinal vesicle breakdown in zebrafish oocytes. *Gen Comp Endocrinol* 176: 426-431.
- Shimakura S-I, Kojima K, Nakamachi T, Kageyama H, Uchiyama M, Shioda S, Takahashi A, Matsuda K (2008) Neuronal interaction between melanin-concentrating hormone- and alpha-melanocyte-stimulating hormone-containing neurons in the goldfish hypothalamus. *Peptides* 29: 1432-1440.
- Shimizu S, Kaiya H, Matsuda K (2014) Stimulatory effect of ghrelin on food intake in bullfrog larvae. *Peptides* 51: 74-79.

- Shin YK, Martin B, Kim W, White CM, Ji S, Sun Y, Smith RG, Sévigny J, Tschöp MH, Maudsley S, Egan JM (2010) Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsivity to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants. *PLoS ONE* 5: e12729.
- Shrestha YB, Wickwire K, Giraudo SQ (2009) Direct effects of nutrients, acetylcholine, CCK, and insulin on ghrelin release from the isolated stomachs of rats. *Peptides* 30: 1187-1191.
- Sibilia V, Lattuada N, Rapetti D, Pagani F, Vincenza D, Bulgarelli I, Locatelli V, Guidobono F, Netti C (2006) Ghrelin inhibits inflammatory pain in rats: involvement of the opioid system. *Neuropharmacology* 51: 497-505.
- Silverstein JT, Plisetskaya EM (2000) The effects of NPY and insulin on food intake regulation in fish. *Am Zool* 40: 296-308.
- Sirotkin AV, Harrath AH, Grossmann R (2016) Comparison of the effects of human and chicken ghrelin on chicken ovarian hormone release. *Comp Biochem Physiol B* 201: 59-63.
- Sjölund K, Sandén G, Håkanson R, Sundler F (1983) Endocrine cells in human intestine: an immunocytochemical study. *Gastroenterology* 85: 1120-1130.
- Skibicka KP, Hansson C, Alvarez-Crespo M, Friberg PA, Dickson SL (2011) Ghrelin directly targets the ventral tegmental area to increase food motivation. *Neuroscience* 180: 129-137.
- Skibicka KP, Hansson C, Egecioglu E, Dickson SL (2012a) Role of ghrelin in food reward: impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression: role of ghrelin in food reward. *Addict Biol* 17: 95-107.
- Skibicka KP, Shirazi RH, Hansson C, Dickson SL (2012b) Ghrelin interacts with neuropeptide Y Y1 and opioid receptors to increase food reward. *Endocrinology* 153: 1194-1205.
- Small BC, Quiniou SMA, Kaiya H (2009) Sequence, genomic organization and expression of two channel catfish, *Ictalurus punctatus*, ghrelin receptors. *Comp Biochem Physiol A* 154: 451-464.
- Smith PM, Ferguson AV (2008) Neurophysiology of hunger and satiety. *Dev Disabil Res Rev* 14: 96-104.
- Sobrino Crespo C, Perianes Cachero A, Puebla Jiménez L, Barrios V, Arilla Ferreiro E (2014) Peptides and food intake. *Front Endocrinol* 5: 58.
- Soengas JL (2014) Contribution of glucose- and fatty acid sensing systems to the regulation of food intake in fish. A review. *Gen Comp Endocrinol* 205: 36-48.
- Soengas JL, Moon TW (1998) Transport and metabolism of glucose in isolated enterocytes of the black bullhead *Ictalurus melas*: effects of diet and hormones. *J Exp Biol* 201: 3263-3273.

- Sokołowska-Mikołajczyk M, Socha M, Szczerbik P, Epler P (2009) The effects of ghrelin on the *in vitro* spontaneous and sGnRH-A stimulated luteinizing hormone (LH) release from the pituitary cells of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp Biochem Physiol A* 153: 386-390.
- Song Y, Duan X, Chen J, Huang W, Zhu Z, Hu W (2015) The distribution of kisspeptin (Kiss)1- and Kiss2-positive neurones and their connections with gonadotrophin-releasing hormone-3 neurones in the zebrafish brain. *J Neuroendocrinol* 27: 198-211.
- Spence R, Fatema MK, Ellis S, Ahmed ZF, Smith C (2007) Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. *J Fish Biol* 71: 304-309.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C (2008) The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol Rev Camb Philos Soc* 83: 13-34.
- Spencer SJ, Emmerzaal TL, Kozicz T, Andrews ZB (2015) Ghrelin's role in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress response: implications for mood disorders. *Biol Psychiatry* 78: 19-27.
- Spencer SJ, Xu L, Clarke MA, Lemus M, Reichenbach A, Geenen B, Kozicz T, Andrews ZB (2012) Ghrelin regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and restricts anxiety after acute stress. *Biol Psychiatry* 72: 457-465.
- Spieler RE, Noeske TA (1984) Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *Trans Am Fish Soc* 113: 528-539.
- Stacey NE, Kyle AL (1983) Effects of olfactory tract lesions on sexual and feeding behavior in the goldfish. *Physiol Behav* 30: 621-628.
- Stanley S, Wynne K, Bloom S (2004) Gastrointestinal satiety signals III. Glucagon-like peptide 1, oxyntomodulin, peptide YY, and pancreatic polypeptide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G693-G697.
- Stark R, Santos VV, Geenen B, Cabral A, Dinan T, Bayliss JA, Lockie SH, Reichenbach A, Lemus MB, Perello M *et al.* (2016) Des-acyl ghrelin and ghrelin O-acyltransferase regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and anxiety in response to acute stress. *Endocrinology* 157: 3946-3957.
- Stasi C, Milani S (2016) Functions of ghrelin in brain, gut and liver. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 15: 956-963.
- Steinert RE, Beglinger C, Langhans W (2015) Intestinal GLP-1 and satiation: from man to rodents and back. *Int J Obes* 40: 198-205.
- Stengel A (2015) Nesfatin-1 - more than a food intake regulatory peptide. *Peptides* 72: 175-183.
- Stengel A, Goebel M, Wang L, Taché Y, Sachs G, Lambrecht NWG (2010) Differential distribution of ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) immunoreactive cells in the mouse and rat gastric oxyntic mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 67-71.

- Stengel A, Taché Y (2014) CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Front Neurosci* 8: 52.
- Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F (1981) Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291: 293-296.
- Sugino T, Yamaura J, Yamagishi M, Ogura A, Hayashi R, Kurose Y, Kojima M, Kangawa K, Hasegawa Y, Terashima Y (2002) A transient surge of ghrelin secretion before feeding is modified by different feeding regimens in sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 785-788.
- Szentirmai E, Hajdu I, Obal F, Krueger JM (2006) Ghrelin-induced sleep responses in *ad libitum* fed and food-restricted rats. *Brain Res* 1088: 131-140.
- Szentirmai E, Kapás L, Sun Y, Smith RG, Krueger JM (2007) Spontaneous sleep and homeostatic sleep regulation in ghrelin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R510-R517.

T

- Takahashi K, Furukawa C, Takano A, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Suzuki C, Yasui W, Inai K, Sone S *et al.* (2006) The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer. *Cancer Res* 66: 9408-9419.
- Takahashi T, Ida T, Sato T, Nakashima Y, Nakamura Y, Tsuji A, Kojima M (2009) Production of n-octanoyl-modified ghrelin in cultured cells requires prohormone processing protease and ghrelin o-acyltransferase, as well as n-octanoic acid. *J Biochem* 146: 675-682.
- Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A *et al.* (2000) Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4908-4911.
- Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, Nakao N, Nakai N, Nakashima K (2001) Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology* 142: 3697-3700.
- Tang-Christensen M, Vrang N, Ortmann S, Bidlingmaier M, Horvath TL, Tschöp M (2004) Central administration of ghrelin and agouti-related protein (83–132) increases food intake and decreases spontaneous locomotor activity in rats. *Endocrinology* 145: 4645-4652.
- Taylor MS, Ruch TR, Hsiao PY, Hwang Y, Zhang P, Dai L, Huang CRL, Berndsen CE, Kim M-S, Pandey A *et al.* (2013) Architectural organization of the metabolic regulatory enzyme ghrelin O-acyltransferase. *J Biol Chem* 288: 32211-32228.
- Tena-Sempere M (2013) Interaction between energy homeostasis and reproduction: central effects of leptin and ghrelin on the reproductive axis. *Horm Metab Res* 45: 919-927.

- Tena-Sempere M, Barreiro ML, González LC, Gaytán F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Diéguez C, Aguilar E (2002) Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143: 717-725.
- Terova G, Rimoldi S, Bernardini G, Gornati R, Saroglia M (2008) Sea bass ghrelin: molecular cloning and mRNA quantification during fasting and refeeding. *Gen Comp Endocrinol* 155: 341-351.
- Thavanathan R, Volkoff H (2006) Effects of amylin on feeding of goldfish: interactions with CCK. *Regul Pept* 133: 90-96.
- Theander-Carrillo C, Wiedmer P, Cettour-Rose P, Nogueiras R, Perez-Tilve D, Pfluger P, Castaneda TR, Muzzin P, Schürmann A, Szanto I *et al.* (2006) Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest* 116: 1983-1993.
- Thompson NM, Gill DAS, Davies R, Loveridge N, Houston PA, Robinson ICAF, Wells T (2004) Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly *in vivo* by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 145: 234-242.
- Tine M, Kuhl H, Teske PR, Tschöp MH, Jastroch M (2016) Diversification and coevolution of the ghrelin/growth hormone secretagogue receptor system in vertebrates. *Ecol Evol* 6: 2516-2535.
- Tinoco AB, Armirotti A, Isorna E, Delgado MJ, Piomelli D, de Pedro N (2014a) Role of oleoylethanolamide as a feeding regulator in goldfish. *J Exp Biol* 217: 2761-2769.
- Tinoco AB, Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ, Isorna E (2014b). Leptin expression is rhythmic in brain and liver of goldfish (*Carassius auratus*). Role of feeding time. *Gen Comp Endocrinol* 204: 239-247.
- Tinoco AB, Nisembaum LG, Isorna E, Delgado MJ, de Pedro N (2012) Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions. *Peptides* 34: 329-335.
- Tinoco AB, Valenciano AI, Gómez-Boronat M, Blanco AM, Nisembaum LG, de Pedro N, Delgado MJ (2015) Two cholecystokinin receptor subtypes are identified in goldfish, being the CCKAR involved in the regulation of intestinal motility. *Comp Biochem Physiol A* 187: 193-201.
- Tokizawa K, Onoue Y, Uchida Y, Nagashima K (2012) Ghrelin induces time-dependent modulation of thermoregulation in the cold. *Chronobiol Int* 29: 736-746.
- Tong J, Prigeon RL, Davis HW, Bidlingmaier M, Kahn SE, Cummings DE, Tschöp MH, D'Alessio D (2010) Ghrelin suppresses glucose-stimulated insulin secretion and deteriorates glucose tolerance in healthy humans. *Diabetes* 59: 2145-2151.
- Toshinai K, Date Y, Murakami N, Shimada M, Mondal MS, Shimbara T, Guan JL, Wang QP, Funahashi H, Sakurai T *et al.* (2003) Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144: 1506-1512.

- Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S (2001) Upregulation of ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 1220-1225.
- Toshinai K, Yamaguchi H, Sun Y, Smith RG, Yamanaka A, Sakurai T, Date Y, Mondal MS, Shimbara T, Kawagoe T *et al.* (2006) Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 147: 2306-2314.
- Tosini G, Chaurasia SS, Michael Iuvone P (2006) Regulation of arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) in the retina. *Chronobiol Int* 23: 381-391.
- Tsang AH, Barclay JL, Oster H (2014) Interactions between endocrine and circadian systems. *J Mol Endocrinol* 52: R1-R16.
- Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913.
- Tso P, Sun W, Liu M (2004) Gastrointestinal satiety signals IV. Apolipoprotein A-IV. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G885-G890.

U

- Ueberberg B, Unger N, Saeger W, Mann K, Petersenn S (2009) Expression of ghrelin and its receptor in human tissues. *Horm Metab Res* 41: 814-821.
- Ugleholdt R (2011) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP): from prohormone to actions in endocrine pancreas and adipose tissue. *Dan Med Bull* 58: B4368.
- Underwood WL (1901) Goldfish as destroyers of mosquito larvae. *Science* 14: 1017-1018.
- Unniappan S (2010) Ghrelin: an emerging player in the regulation of reproduction in non-mammalian vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 167: 340-343.
- Unniappan S, Canosa LF, Peter RE (2004) Orexigenic actions of ghrelin in goldfish: feeding-induced changes in brain and gut mRNA expression and serum levels, and responses to central and peripheral injections. *Neuroendocrinology* 79: 100-108.
- Unniappan S, Lin X, Cervini L, Rivier J, Kaiya H, Kangawa K, Peter RE (2002) Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology* 143: 4143-4146.
- Unniappan S, Peter RE (2004) *In vitro* and *in vivo* effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: R1093-R1101.
- Unniappan S, Peter RE (2005) Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comp Biochem Physiol A* 140: 396-408.

V

- Valenti M, Cottone E, Martinez R, de Pedro N, Rubio M, Viveros MP, Franzoni MF, Delgado MJ, Di Marzo V (2005) The endocannabinoid system in the brain of *Carassius auratus* and its possible role in the control of food intake. *J Neurochem* 95: 662-672.
- Vallejo-Cremades M., Gómez-García L, Chacatas-Cortesao M, Moreno C, Sánchez M, De Miguel E, Gómez de Segura I (2004) Enriched protein diet-modified ghrelin expression and secretion in rats. *Regul Pept* 121: 113-119.
- Vandepoele K, De Vos W, Taylor JS, Meyer A, Van de Peer Y (2004) Major events in the genome evolution of vertebrates: paranome age and size differ considerably between ray-finned fishes and land vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1638-1643.
- Vecino E, Perez MT, Ekström P (1994) *In situ* hybridization of neuropeptide Y (NPY) mRNA in the goldfish brain. *Neuroreport* 6: 127-131.
- Velarde E, Cerdá-Reverter JM, Alonso-Gómez AL, Sánchez E, Isorna E, Delgado MJ (2010) Melatonin-synthesizing enzymes in pineal, retina, liver, and gut of the goldfish (*Carassius*): mRNA expression pattern and regulation of daily rhythms by lighting conditions. *Chronobiol Int* 27: 1178-1201.
- Velasco C, Librán-Pérez M, Otero-Rodiño C, López-Patiño MA, Míguez JM, Cerdá-Reverter JM, Soengas JL (2016a) Ghrelin modulates hypothalamic fatty acid-sensing and control of food intake in rainbow trout. *J Endocrinol* 228: 25-37.
- Velasco C, Librán-Pérez M, Otero-Rodiño C, López-Patiño MA, Míguez JM, Soengas JL (2016b). Intracerebroventricular ghrelin treatment affects lipid metabolism in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 228: 33-39.
- Vivas Y, Azpeleta C, Feliciano A, Velarde E, Isorna E, Delgado MJ, de Pedro N (2011) Time-dependent effects of leptin on food intake and locomotor activity in goldfish. *Peptides* 32: 989-995.
- Volante M, Fulcheri E, Allia E, Cerrato M, Pucci A, Papotti M (2002) Ghrelin expression in fetal, infant, and adult human lung. *J Histochem Cytochem* 50: 1013-1021.
- Volkoff H (2006) The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comp Biochem Physiol A* 144: 325-331.
- Volkoff H (2015) Cloning, tissue distribution and effects of fasting on mRNA expression levels of leptin and ghrelin in red-bellied piranha (*Pygocentrus nattereri*). *Gen Comp Endocrinol* 217-218: 20-27.
- Volkoff H (2016) The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Front Neurosci* 10: 540.
- Volkoff H, Canosa LF, Unniappan S, Cerdá-Reverter JM, Bernier NJ, Kelly SP, Peter RE (2005) Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen Comp Endocrinol* 142:

3-19.

- Volkoff H, Eykelbosh AJ, Peter RE (2003) Role of leptin in the control of feeding of goldfish *Carassius auratus*: interactions with cholecystokinin, neuropeptide Y and orexin A, and modulation by fasting. *Brain Res* 972: 90-109.
- Volkoff H, Peter RE (2001) Interactions between orexin A, NPY and galanin in the control of food intake of the goldfish, *Carassius auratus*. *Regul Pept* 101: 59-72.
- Volkoff H, Unniappan S, Kelly SP (2009) The endocrine regulation of food intake. En: *Fish Neuroendocrinology* (AP Farrel y CJ Brauner, eds), Academic Press, San Diego, Estados Unidos. pp. 421-465.
- Volkow ND, Wang G-J, Baler RD (2011) Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. *Trends Cogn Sci* 15: 37-46.
- Vornanen M, Asikainen J, Haverinen J (2011) Body mass dependence of glycogen stores in the anoxia-tolerant crucian carp (*Carassius carassius* L.). *Naturwissenschaften* 98: 225-232.
- Vu JP, Larauche M, Flores M, Luong L, Norris J, Oh S, Liang LJ, Waschek J, Pisegna JR, Germano PM (2015) Regulation of appetite, body composition, and metabolic hormones by vasoactive intestinal polypeptide (VIP). *J Mol Neurosci* 56: 377-387.
- Vucetic Z, Reyes TM (2010) Central dopaminergic circuitry controlling food intake and reward: implications for the regulation of obesity. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2: 577-593.



- Wada R, Sakata I, Kaiya H, Nakamura K, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T (2003) Existence of ghrelin-immunopositive and -expressing cells in the proventriculus of the hatching and adult chicken. *Regul Pept* 111: 123-128.
- Wang JX, Li P, Peng KM, Jin SHZ (2011) cDNA cloning of ghrelin and ontogeny of ghrelin mRNA expression in the gastrointestinal tract of African ostrich chicks. *Regul Pept* 167: 50-55.
- Wang Q, Liu C, Uchida A, Chuang JC, Walker A, Liu T, Osborne-Lawrence S, Mason BL, Mosher C, Berglund ED *et al.* (2014) Arcuate AgRP neurons mediate orexigenic and glucoregulatory actions of ghrelin. *Mol Metab* 3: 64-72.
- Wang WG, Chen X, Jiang H, Jiang Z-Y (2008) Effects of ghrelin on glucose-sensing and gastric distension sensitive neurons in rat dorsal vagal complex. *Regul Pept* 146: 169-175.
- Wang Z, Du J, Lam S, Mathavan S, Matsudaira P, Gong Z (2010) Morphological and molecular evidence for functional organization along the rostrocaudal axis of the adult zebrafish intestine. *BMC Genomics* 11: 392.

- Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Dembinski M, Cieszkowski J, Konturek SJ, Polus A, Pawlik WW, Kuwahara A, Kato I, Konturek PC (2006) Influence of ghrelin on gastric and duodenal growth and expression of digestive enzymes in young mature rats. *J Physiol Pharmacol* 57: 425-437.
- Watts AG, Donovan CM (2010) Sweet talk in the brain: glucosensing, neural networks, and hypoglycemic counterregulation. *Front Neuroendocrinol* 31: 32-43.
- Wei W, Wang G, Qi X, Englander EW, Greeley GH (2005) Characterization and regulation of the rat and human ghrelin promoters. *Endocrinology* 146: 1611-1625.
- Weikel JC, Wichniak A, Ising M, Brunner H, Friess E, Held K, Mathias S, Schmid DA, Uhr M, Steiger A (2003) Ghrelin promotes slow-wave sleep in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E407-E415.
- Westerfield M (2000) *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*, 4th Edition. University of Oregon Press, Oregon, Estados Unidos. 319 pp.
- Wiedmer P, Strasser F, Horvath TL, Blum D, Dimarchi R, Lutz T, Schürmann A, Joost HG, Tschöp MH, Tong J (2011) Ghrelin-induced hypothermia: a physiological basis but no clinical risk. *Physiol Behav* 105: 43-51.
- Wilson JL, Enriori PJ (2015) A talk between fat tissue, gut, pancreas and brain to control body weight. *Mol Cell Endocrinol* 418: 108-119.
- Witek B, Ochwanowska E, Rafay J, Kolataj A, Chrenek P, Suvegova K, Jurcik R, Sirotkin A, Darlak K (2005) Effect of ghrelin on activities of some lysosomal hydrolases in rabbits. *Neuro Endocrinol Lett* 26: 397-400.
- Wixon J (2000) *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast* 1: 225-231.
- Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR (2001) Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5992.
- Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR (2000) The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141: 4325-4328.
- Wu R, Zhou M, Cui X, Simms HH, Wang P (2003) Ghrelin clearance is reduced at the late stage of polymicrobial sepsis. *Int J Mol Med* 12: 777-781.
- Wullimann MF, Mueller T (2004) Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *J Comp Neurol* 475: 143-162.
- Wynne K, Bloom SR (2006) The role of oxyntomodulin and peptide tyrosine-tyrosine (PYY) in appetite control. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2: 612-620.
- Wynne K, Field BC, Bloom SR (2010) The mechanism of action for oxyntomodulin in the regulation of obesity. *Curr Opin Investig Drugs* 11: 1151-1157.

X

- Xie P, Wan XP, Bu Z, Zou XT (2016) Molecular cloning, characterization, and expression analysis of ghrelin and cholecystokinin in the pigeon (*Columba livia*). *Poult Sci* 95: 2655-2666.
- Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS (2005) PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 115: 951-958.
- Xu Q, Bian H, Han N, Hou R, Zhang Z, Zhu M (2010) cDNA cloning and expression of ghrelin in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Mol Biol Rep* 37: 2903-2907.

Y

- Yada T, Dezaki K, Sone H, Koizumi M, Damdindorj B, Nakata M, Kakei M (2008) Ghrelin regulates insulin release and glycemia: physiological role and therapeutic potential. *Curr Diabetes Rev* 4: 18-23.
- Yakabi K, Kawashima J, Kato S (2008) Ghrelin and gastric acid secretion. *World J Gastroenterol* 14: 6334-6338.
- Yang J, Brown MS, Liang G, Grishin NV, Goldstein JL (2008a) Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132: 387-396.
- Yang J, Zhao T-J, Goldstein JL, Brown MS (2008b) Inhibition of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) by octanoylated pentapeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10750-10755.
- Yang L, Scott KA, Hyun J, Tamashiro KL, Tray N, Moran TH, Bi S (2009) Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide y in modulating food intake and energy balance. *J Neurosci* 29: 179-190.
- Yasuda T, Masaki T, Kakuma T, Yoshimatsu H (2003) Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neurosci Lett* 349: 75-78.
- Yeo GSH, Heisler LK (2012) Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat Neurosci* 15: 1343-1349.
- Yeung CM, Chan CB, Woo NY, Cheng CH (2006) Seabream ghrelin: cDNA cloning, genomic organization and promoter studies. *J Endocrinol* 189: 365-379.
- Yin Y, Li Y, Zhang W (2014) The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci* 15: 4837-4855.
- Yoshimoto A, Mori K, Sugawara A, Mukoyama M, Yahata K, Suganami T, Takaya K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K (2002) Plasma ghrelin and desacyl ghrelin concentrations in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 13: 2748-2752.

Yuan J, Zhou J, Hu X, Li N (2007) Molecular cloning and comparison of avian preproghrelin genes. *Biochem Genet* 45: 185-194.

Yuan X, Cai W, Liang X-F, Su H, Yuan Y, Li A, Tao YX (2015) Obestatin partially suppresses ghrelin stimulation of appetite in “high-responders” grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Comp Biochem Physiol A* 184: 144-149.

Z

Zhang JV (2005) Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310: 996-999.

Zhang W, Chen M, Chen X, Segura BJ, Mulholland MW (2001) Inhibition of pancreatic protein secretion by ghrelin in the rat. *J Physiol* 537: 231-236.

Zhang YK, Yeager RL, Klaassen CD (2009) Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 37: 106-115.

Zhao Z, Sakata I, Okubo Y, Koike K, Kangawa K, Sakai T (2008) Gastric leptin, but not estrogen and somatostatin, contributes to the elevation of ghrelin mRNA expression level in fasted rats. *J Endocrinol* 196: 529-538.

Zhou C, Zhang X, Liu T, Wei R, Yuan D, Li Z (2012) Cloning and prokaryotic expression of ghrelin gene in crucian carp (*Carassius auratus*). *Afr J Microbiol Res* 6: 5222-5228.

Zhou C, Zhang X, Liu T, Wei R, Yuan D, Wang T, Lin F, Wu H, Chen F, Yang S, Chen D, Wang Y, Li Z (2014a) *Schizothorax davidi* ghrelin: cDNA cloning, tissue distribution and indication for its stimulatory character in food intake. *Gene* 534: 72-77.

Zhou C, Zheng J, Lei L, Yuan D, Zhu C, Ye H, Zhang C, Wang D, Yang M, Wu J, Zhu L, Zeng B (2016) Evidence that ghrelin may be associated with the food intake of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiol Biochem* 42: 1367-1646.

Zhou CH, Li X, Zhu Y-Z, Huang H, Li J, Liu L, Hu Q, Ma T-F, Shao Y, Wu Y-Q (2014b) Ghrelin alleviates neuropathic pain through GHSR-1a-mediated suppression of the p38 MAPK/NF-κB pathway in a rat chronic constriction injury model. *Reg Anesth Pain Med* 39: 137-148.

Zigman JM, Jones JE, Lee CE, Saper CB, Elmquist JK (2006) Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol* 494: 528-548.



Anexos metodológicos

MODELOS ANIMALES. MANTENIMIENTO, MANIPULACIÓN Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Los modelos animales son la herramienta esencial para llevar a cabo gran parte de la investigación científica. Se puede considerar a un animal de laboratorio como cualquier especie animal que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos (Hernández, 2006). El uso de modelos animales en el ámbito de la investigación tiene su origen hace siglos, encontrándose las primeras referencias a la experimentación con animales en los escritos de los griegos en los siglos II y IV AC. Desde entonces, los animales se han empleado repetidamente a lo largo de la historia de la investigación científica. En 1959, William Russell y Rex Burch, en su famoso libro “*The principles of humane animal experimental techniques*”, exponen que la excelencia científica está fuertemente ligada al uso humanitario de los animales de laboratorio y definen las normas en las que se basan los principios éticos en la investigación con animales como “las tres Rs”: Reducir, Reemplazar y Refinar. Estos son los fundamentos de una racional e inteligente estrategia para minimizar el uso de animales y las causas de dolor y de distrés (Russell *et al.*, 1959; Goldberg *et al.*, 1996).

En la presente Tesis Doctoral, los estudios se han llevado a cabo empleando dos modelos animales de peces teleósteos, el carpín (*Carassius auratus*) y el pez cebra (*Danio rerio*). En este Anexo se detallan las condiciones de mantenimiento y manipulación de los animales, y los procedimientos de obtención de muestras relativas a ambas especies. Los ejemplares de carpín utilizados han sido mantenidos en las instalaciones autorizadas de la Universidad Complutense de Madrid (centro principal de realización de esta Tesis) y del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá). Los ejemplares de pez cebra se han manipulado en las instalaciones del Instituto de Acuicultura Torre de la Sal del CSIC (Castellón, España). Todos los procedimientos realizados en la Universidad Complutense han sido autorizados por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid y la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Comunidad de Madrid. Asimismo, cumplen la normativa española vigente durante su desarrollo, según el Real Decreto 53/2013 y la Directiva europea 2010/63/UE. Los procedimientos llevados a cabo en Canadá se adhirieron al Consejo Canadiense de Protección de los Animales, y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Consejo de Ética de la Investigación de la Universidad de Saskatchewan.

I.1. Mantenimiento de las especies de estudio

Ofrecer a los animales de laboratorio un ambiente adecuado acorde a los requisitos de cada especie garantiza su bienestar y minimiza las condiciones estresantes. Asimismo, existe abundante información que confirma la importancia del entorno en que los animales de laboratorio se mantienen y cómo éste influye en los resultados experimentales que se obtienen (Tuffery, 1995). Las dos especies de estudio empleadas en los trabajos incluidos en la presente Tesis, si bien son ambas de agua dulce, presentan diferentes exigencias y condiciones de mantenimiento.

I.1.1. *Carpín*

El carpín es una especie de agua fría muy resistente, capaz de tolerar intervalos de temperatura y pH muy amplios. En el laboratorio, los ejemplares de esta especie (siempre adultos) se mantuvieron en acuarios de 60 l (densidad 4,5 g/l) con agua dulce previamente filtrada y desclorada y con 3.000 ppm de sal común (Luz *et al.*, 2008). Cada acuario se dotó de un sistema continuo de aireación y filtración de agua (mecánica y biológica). El volumen total de agua de los acuarios se renovaba con periodicidad mensual. Se emplearon kits comerciales (Sera) para controlar semanalmente propiedades físico-químicas del agua, como el pH, dureza y niveles de amonio, nitritos y nitratos. La temperatura del agua se mantuvo a $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ mediante un sistema de climatización automático de toda la instalación. Asimismo, cada acuario estaba provisto de un sistema de iluminación (4.000 lux) controlado automáticamente para proporcionar un fotoperiodo diario de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, generalmente marcado por el encendido de las luces a las 8:00 (**Fotografía I.1**).



Fotografía I.1. Acuario con ejemplares de carpín empleados en los estudios de la presente Tesis Doctoral.

Durante los periodos de aclimatación, la alimentación de los carpines se llevó a cabo a base de pienso comercial en escamas diseñado para peces de estanque (*Pond Flakes*, Sera) de la siguiente composición: 21% proteína, 2,7% grasas, 0,5% fibra, 4,1% cenizas y 6,7% humedad, suplementado con vitaminas (A, B₁, B₂, C, D₃ y E), minerales, antioxidantes y colorantes. La administración de alimento (1% del peso corporal) se efectuó una vez cada día, generalmente a las 10:00, mediante un sistema de comederos automáticos (Eheim).

1.1.2. *Pez cebra*

El pez cebra es una especie de agua tropical, más sensible que el carpín a las características físico-químicas del agua donde habita. El mantenimiento de los ejemplares de esta especie se realizó en una instalación dotada de sistemas de recirculación cerrada de agua. Los tanques empleados en estos sistemas variaron en función de la edad y la finalidad de uso de los peces. Así, los peces en estadio larvario y alevín fueron mantenidos en acuarios de 6 l, mientras que los adultos en acuarios de 20 ó 26 l, excepto en la fase reproductora que eran colocados de manera individual en tanques de 1,5 l (**Fotografía I.2**). El agua del sistema recirculaba constantemente a través de filtros biológicos y mecánicos, y era renovada parcialmente con periodicidad semanal. Diariamente se llevó un control de su temperatura (siempre mantenida entre 27-28°C), pH (en torno a 7) y conductividad (entre 300-500 $\mu\text{S}/\text{cm}$). El fotoperiodo venía dado por el control automático de la iluminación de la instalación y consistía en un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad, con encendido de las luces a las 7:00.



Fotografía I.2. Racks de acuarios con ejemplares de pez cebra empleados en los estudios de la presente Tesis Doctoral. A. Vista general del sistema de recirculación alojando los tanques de mantenimiento de los ejemplares adultos. B. Tanques de mantenimiento de larvas y juveniles. C. Tanques de mantenimiento de adultos reproductores.

La alimentación de los peces cebras, al igual que su mantenimiento, varió según la edad de los ejemplares. La dieta de los adultos constó de dos tipos de alimento: procesado y vivo. El alimento procesado consistió en una mezcla proporcional de dos tipos de piensos en escamas comerciales: alimento base (*Vipan*, Sera, de composición: 46,2% proteína, 8,9% grasas, 2,3% fibra, 11,9% cenizas y 6,7% humedad, suplementado con vitaminas A, B₁, B₂, C, D₃ y E y colorantes) y alimento *Gala Premium* (JBL, de composición: 45% proteína, 8% grasas, 2% fibra y 9% ceniza, suplementado con vitaminas A, C, D₃ y E e inositol). Este tipo de dieta fue administrada manualmente durante las primeras horas de la mañana. El alimento vivo consistió en larvas de *Artemia sp.* administradas al final de la mañana y a la tarde. La artemia era obtenida a partir de quistes adquiridos comercialmente (Inve), cuya eclosión se induce en 24 horas en agua de mar con iluminación y oxigenación constante. Tras este tiempo, las artemias vivas se separan de las muertas y de los quistes no eclosionados mediante un tamiz especial que permite su separación en función de la capacidad fototáctica positiva que presentan las larvas vivas. Antes de ser administrada a los peces, la artemia debe ser lavada con agua dulce destilada para eliminar el agua de mar. Respecto a las fases tempranas del desarrollo, la alimentación se inició el día 6 después de la puesta de los huevos, con el siguiente cronograma: 5 días de alimentación a base de alimento comercial en escamas diseñado para larvas (*Microvit Hi-Protein*, Tropical; composición: 49% proteína, 8,5% grasas y aceites, 3% fibra y 6% humedad, complementado con vitaminas A, C, D₃, E y L-carnitina, oligoelementos, lecitina y colorantes), 5 días de alimentación a base de alimento comercial para larvas y artemia, 5 días de alimentación con artemia, 5 días de alimentación con artemia y pienso comercial de adultos triturado, y un mes de alimentación únicamente a base de pienso comercial de adultos triturado. Tras este tiempo, se les suministró la dieta descrita para los ejemplares adultos.

1.2. Reproducción del pez cebra

Los trabajos realizados en la presente Tesis Doctoral empleando como modelo el pez cebra, al tratarse de estudios de manipulación genética durante el desarrollo embrionario, implicaron la necesidad de su reproducción. En cautividad, los peces cebra se reproducen en peceras pequeñas denominadas comúnmente parideras que se caracterizan por presentar un doble fondo, el más interno de ellos dividido longitudinalmente de tal manera que permite el paso de los huevos al fondo más externo, pero no de individuos adultos, asegurando que no sean devorados por sus progenitores. Además, presentan una división transversal que permite la separación de individuos a ambos lados sin que exista contacto entre ellos. Para que tenga lugar la reproducción, el día antes de la puesta una hembra y un macho

reproductor son colocados en cada compartimento de la paridera (**Fotografía I.3**). Al día siguiente, se retira la división transversal de la paridera permitiendo el contacto físico entre la pareja y, tras un cortejo que implica principalmente la persecución del macho a la hembra para intentar golpear su cola con la cabeza, la hembra expulsa cientos de huevos y el macho libera los espermatozoides que fecundarán los óvulos.



Fotografía I.3. Paridera con reproductores de pez cebra en cautividad.

La reproducción de los peces cebra puede tener lugar semanalmente. El proceso se encuentra muy influido por factores externos, como la calidad del agua, la iluminación y el tipo de alimentación, por lo que es necesario que todos estos factores se controlen de manera apropiada. La calidad adecuada del agua se aseguró llenando las parideras con agua procedente del mismo sistema de recirculación en el que los reproductores son mantenidos, de forma que no deban afrontar el hecho de encontrarse en un agua distinta. La iluminación es importante debido a que el desove y la fecundación suelen producirse a primeras horas de la mañana. Por ello, las parideras se colocaron en condiciones de oscuridad artificial (en el interior de cajas) que permitían la simulación del inicio de las horas de luz en cualquier momento de la mañana. Finalmente, la alimentación fue especialmente controlada en los individuos reproductores los días anteriores a su separación para las puestas.

Tras las puestas, se procedió a recoger los huevos colocándolos en una placa Petri con agua destilada conteniendo 3,5 ppm de sal común. En la presente Tesis Doctoral, los huevos obtenidos en los primeros cruces (F_0) fueron microinyectados para la obtención de individuos fundadores en el proceso de generación de líneas transgénicas o *knockouts*, como se detalla en el Anexo metodológico VI. Tras las inyecciones o a continuación de su separación en caso de una reproducción habitual, los huevos se mantuvieron en agua destilada conteniendo 3,5 ppm de sal común con unas gotas de azul de metileno para reducir la aparición de infecciones. Las primeras fases del desarrollo tuvieron lugar en un incubador a 28°C, donde al

cabo de 48-72 h la mayoría de los huevos eclosionan. Las larvas fueron introducidas en los acuarios de los sistemas de recirculación el día 5 después de la fecundación, si bien el circuito de renovación de agua no se abrió hasta una semana más tarde. En la **Figura I.1** se muestran esquemáticamente las fases del desarrollo de esta especie, desde el cigoto hasta el estadio adulto, que se alcanza alrededor de los tres meses.

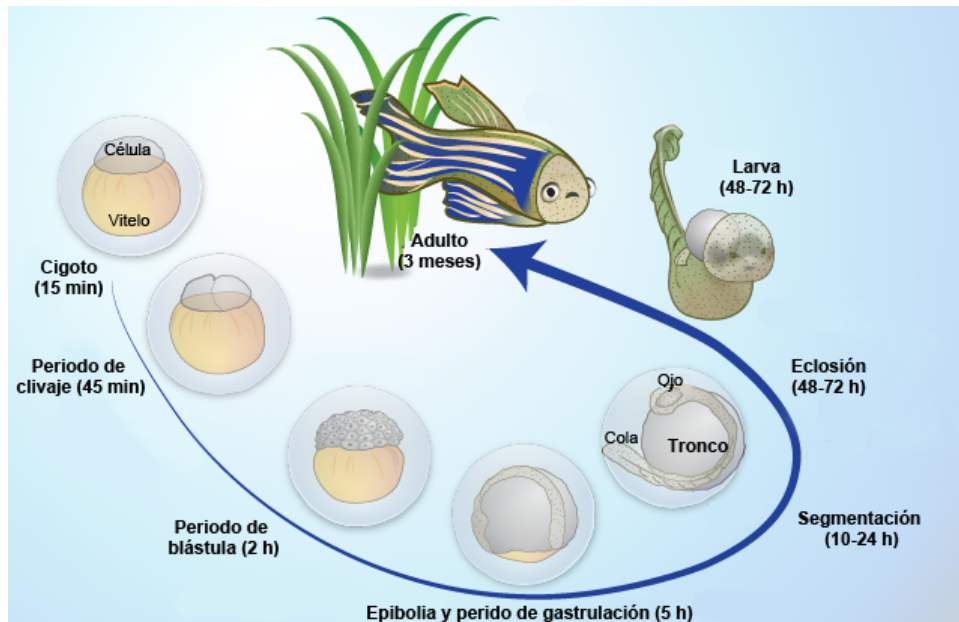


Figura I.1. Fases del desarrollo del pez cebra.

I.3. Técnicas de anestesia

Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de anestesia con el fin de minimizar el estrés de los animales. En los experimentos de la presente Tesis Doctoral, los anestésicos se administraron a través del agua (baños-inmersión). Este método se basa en la disolución del anestésico en agua y la posterior inmersión en ella de los peces durante un corto periodo de tiempo. La absorción del fármaco por parte del pez se produce fundamentalmente por el epitelio de las branquias y, en menor medida, por el epitelio olfatorio, ya que la absorción a través de la piel se encuentra limitada por la presencia de escamas y mucus. Los anestésicos empleados son la tricaina-metanosulfonato (MS-222; dosis 0,1 g/l, para el carpín) y el 2-fenoxietanol (dosis 0,5 ml/l, para el pez cebra). Ambos son anestésicos habitualmente utilizados en experimentación con peces y otros animales acuáticos, por la sencillez de su uso y por no producir alteraciones en parámetros como la ingestión de alimento (Weber *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2011). Los animales se consideraron anestesiados cuando mostraban pérdida del equilibrio, detención de la actividad natatoria, y menor frecuencia ventilatoria opercular y bucal.

I.4. Administración intraperitoneal (IP) de fármacos y hormonas

En los trabajos de la presente Tesis, la inyección IP se empleó como método de administración de glucosa, ghrelina y otras hormonas gastrointestinales (como CCK, PYY y GLP-1) a ejemplares de carpín. Las inyecciones fueron realizadas con jeringuillas de plástico de 1 ml y agujas de 0,5 mm de diámetro. Para ello, el animal es anestesiado (como se detalla en el apartado 1.3) y pesado con el fin de ajustar el volumen de inyección al peso corporal (10 μ l/g pez). A continuación, se coloca el pez con la cara ventral hacia arriba en un molde de parafina que actúa como soporte. La aguja se introduce entre las aletas ventrales, a pocos mm de la línea media ventral, a una profundidad de aproximadamente 5 mm y una inclinación de unos 45°, y se procede lentamente a la inyección del volumen correspondiente. Es importante que al liberar la solución en el peritoneo ninguno de los órganos se vea dañado, por lo que la inserción de la aguja se hace siempre en dirección hacia la cola (**Figura I.2**).

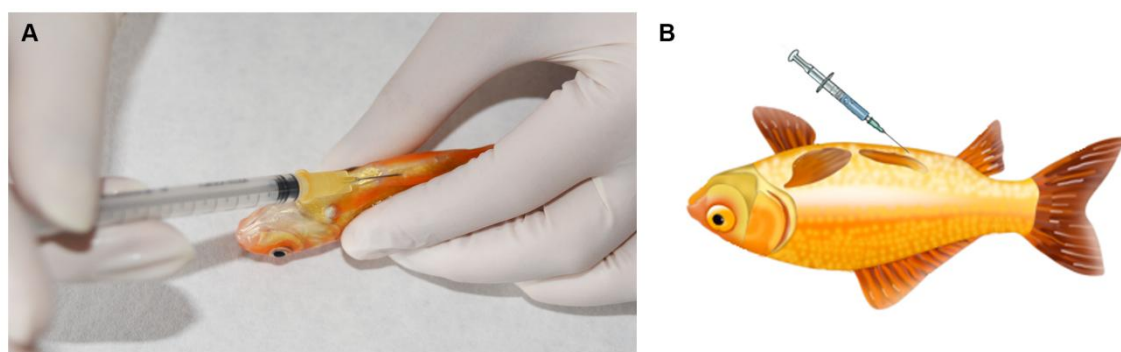


Figura I.2. A. Administración intraperitoneal en el carpín. B. Esquema mostrando la posición de inserción de la aguja durante la inyección.

I.5. Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas utilizadas para los estudios incluidos en la presente Tesis Doctoral consistieron en muestras de sangre y de algunos tejidos de las especies de estudio. En este apartado se detallan los procedimientos de obtención, manipulación y conservación de dichas muestras.

I.5.1. Extracción de sangre

Las muestras de sangre se extrajeron por punción de la vena caudal de animales anestesiados, inmediatamente por debajo de la línea lateral y a 1-2 cm de la base de la aleta caudal (**Figura I.3**). Se utilizaron jeringuillas de plástico de 1 ml y agujas de 0,5 mm de diámetro previamente heparinizadas (heparina al 1%). La sangre se recogió en tubos, también heparinizados, mantenidos en un baño de agua-hielo. Inmediatamente después de la

extracción, la sangre se centrifugó a 5.000 g durante 10 min a 4°C para obtener el plasma, que se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización. La técnica de extracción de sangre se llevó a cabo únicamente en ejemplares de carpín.

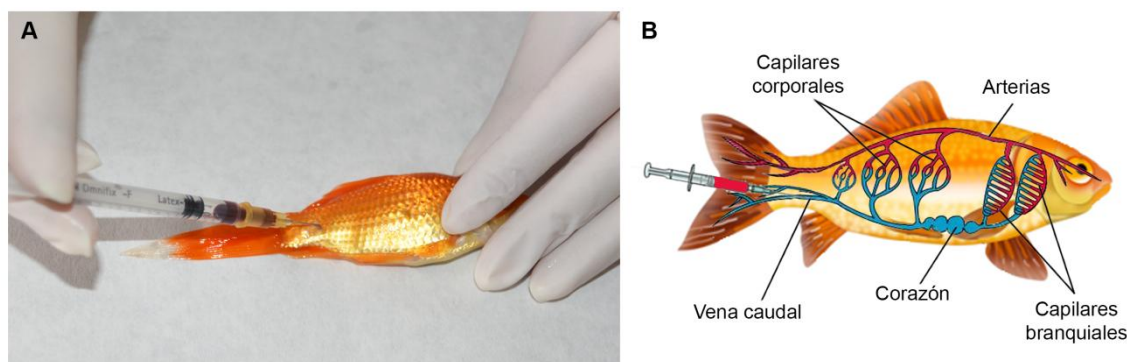


Figura I.3. A. Extracción de sangre de la vena caudal del carpín. B. Esquema mostrando el sistema circulatorio de peces teleósteos, indicando la posición de la vena caudal.

1.5.2. Extracción de tejidos

Las muestras de tejidos se extrajeron de animales sacrificados por sobredosis de anestésico (0,2 g/l). Los tejidos extraídos para los estudios de la presente Tesis Doctoral variaron en función de la especie de estudio. En el caso del carpín, tras el sacrificio se procedió a la extracción del cerebro mediante una sección de las uniones óseas del cráneo y, con ayuda de una lupa binocular, se realizó la disección de las siguientes regiones encefálicas: telencéfalo, hipotálamo, hipófisis y lóbulo vagal (**Figura I.4**). También se procedió a la extracción de tejidos periféricos, como el tracto gastrointestinal y el hígado. Del tracto gastrointestinal se separó el bulbo intestinal (ensanchamiento del intestino localizado al inicio del mismo, inmediatamente posterior al esófago) y una porción de intestino anterior, considerada como el primer cm de intestino después del bulbo intestinal (véase el apartado 3.1 de la Introducción para detalles de la anatomía periférica del carpín). El hígado se limpió de restos visibles de tejido adiposo y se colectaron aproximadamente 15 mg. Respecto al pez cebra, se extrajeron muestras de cerebro completo, intestino anterior (primer cm) e hígado. De esta última especie también se extrajeron muestras de una pequeña porción de la parte final de la cola que fue seccionada a partir de animales anestesiados, sin proceder a su sacrificio. Tanto para el carpín como para el pez cebra, los tejidos extraídos se distribuyeron en placas estériles de 24 pocillos (para los experimentos de cultivos organotípicos; véase el Anexo metodológico III), o bien se introdujeron en tubos estériles y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras congeladas se conservaron a -80°C hasta su utilización para técnicas de biología molecular (véase el Anexo metodológico II) o para el genotipado de peces cebra (véase el Anexo metodológico VI).

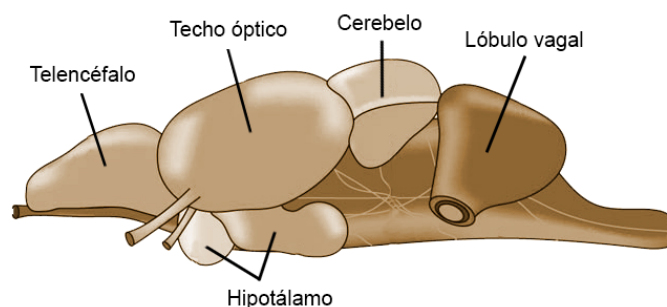


Figura I.4. Esquema de las áreas encefálicas del carpín.

La extracción de muestras de tejidos fue ligeramente diferente en los estudios inmunohistoquímicos. Esta técnica requiere que los tejidos mantengan su estructura anatómica original después del sacrificio de los animales, lo que se consigue mediante el empleo de sustancias químicas con propiedades fijadoras (Buchwalow y Böcker, 2010). Así, a ejemplares sacrificados de carpín se les levantó el techo de la cavidad craneal y se les realizó una apertura en la cavidad corporal, de manera que el cerebro y el paquete visceral queden expuestos, tras lo cual se sumergieron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 24 h para su fijación. Pasado este tiempo, se procedió a la extracción del cerebro, la porción anterior del tracto gastrointestinal y una porción de hígado, que fueron sumergidos en una nueva solución de paraformaldehído al 4% durante al menos 3 horas. El mismo procedimiento se realizó en ejemplares de pez cebra, aunque únicamente con muestras de intestino. Los procesos de fijación se llevaron a cabo siempre en un intervalo de temperaturas entre 0-4°C para evitar la acción de endonucleasas endógenas que puedan destruir el material de estudio, y nunca durante más de 24 h ya que tiempos prolongados debilitan el marcaje. El proceso posterior a la extracción y fijación de los tejidos para inmunohistoquímica se detalla en el Anexo metodológico IV.

Bibliografía

- Buchwalow IB, Böcker W (2010) Probes processing in immunohistochemistry. En: *Immunohistochemistry: basics and methods*. Springer, Heidelberg, Alemania. pp. 19-30.
- Carter KM, Woodley CM, Brown RS (2011) A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 21: 51-59.
- Goldberg AM, Zurlo J, Rudacille D (1996) The three Rs and biomedical research. *Science* 272: 1403.
- Hernández S (2006) El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina* 2: 252-256.

- Luz RK, Martínez-Ivarez RM, de Pedro N, Delgado MJ (2008) Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities. *Aquaculture* 276: 171-178.
- Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen, Londres, Reino Unido. 238 pp.
- Tuffery AA (1995) *Laboratory animals: an introduction for experimenters*. John Wiley & Sons, Nueva York, Estados Unidos. 406 pp.
- Weber RA, Peleteiro JB, García Martín LO, Aldegunde M (2009) The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Aquaculture* 288: 147-150.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS

La biología molecular, como su nombre indica, tiene como objetivo el estudio de los procesos biológicos a nivel molecular. En la presente Tesis Doctoral se utilizaron diversas técnicas de biología molecular tanto para ácidos nucleicos, enfocadas principalmente al análisis de la expresión génica y la identificación de nuevos genes en el carpín y al genotipado de peces cebra, como para proteínas, orientadas fundamentalmente al análisis de su traducción. Las técnicas que se describen a continuación se han realizado en el laboratorio principal de realización de esta Tesis, así como en los laboratorios de la Doctora Catalina Hernández Sánchez en el Instituto de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid, España), del Doctor José Miguel Cerdá-Reverter en el Instituto de Acuicultura Torre de la Sal del CSIC (Castellón, España) y del Doctor Suraj Unniappan en la Universidad de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá).

II.1. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular. Puede realizarse mediante diversos métodos que implican, de manera general, la lisis celular, la inactivación de las nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los restos de células. En el presente trabajo, los métodos de extracción utilizados permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de muestras de distintos tejidos extraídos de las especies de estudio aquí empleadas.

II.1.1. Extracción de ARN

El método de extracción de ARN utilizado en la presente Tesis Doctoral es una modificación de la técnica descrita en 1987 por Chomczynski y Sacchi, basada en el uso de una sal de guanidina y de una solución de fenol:cloroformo acidificada. La sal de guanidina empleada fue el reactivo comercial TRI *Reagent* (Sigma), que es una solución monofásica de tiocianato de guanidina y fenol en la que se solubiliza el tejido y que, tras la adición de cloroformo, se separa en tres fases: una fase acuosa conteniendo el ARN, una interfase con el ADN y una fase orgánica donde quedan las proteínas. El ARN que se obtiene mediante este

método se corresponde con el ARN total presente en la muestra, sin separarse los diferentes tipos que existen de este ácido nucleico.

Procedimiento:

1) Homogeneización del tejido

- Homogeneizar el tejido en TRI *Reagent* (1 ml por cada 50-100 mg de tejido) empleando métodos de disrupción mecánica como jeringuillas o ULTRA-TURRAX®.
- Incubar el homogeneizado durante 5 min a temperatura ambiente.

2) Separación de fases

- Añadir 200 µl de cloroformo por cada 1 ml de TRI *Reagent* usado en la homogeneización y agitar vigorosamente durante 15 s.
- Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.

3) Precipitación del ARN

- Añadir 500 µl de isopropanol por cada 1 ml de TRI *Reagent* y mezclar por inversión.
- Incubar durante 20-30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C.

4) Lavado del ARN

- Eliminar el sobrenadante.
- Añadir 1 ml de etanol 75% frío (-20°C) y agitar en vórtex.
- Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C.

5) Solubilización del ARN

- Eliminar el etanol de lavado y secar ligeramente el precipitado al aire.
- Resuspender en 20-50 µl de H₂O DEPC (DEPC: dietil pirocarbonato, inactiva a las ARNasas).

6) Tratamiento del ARN con ADNasa (para eliminar posibles restos de ADN)

- Preparar la siguiente mezcla:

Muestra (ARN)	1-2 µg
Tampón o <i>buffer</i> 10x ADNasa	1 µl
ADNasa RQ1 (Promega M6101)	1 µl/ µg ARN
H ₂ O DEPC	Hasta completar volumen de 10 µl

- Incubar durante 30 min a 37°C.
- Añadir 1 µl de solución de parada.

- Incubar durante 10 min a 65°C para inactivar la ADNasa.
- Conservar a -80°C.

II.1.2. Extracción de ADN

En la presente Tesis Doctoral se han empleado dos métodos de extracción de ADN genómico. El primero es una continuación del método previamente descrito para la extracción de ARN basado en la utilización de una sal de guanidina (*Tri Reagent*) y una solución de fenol:cloroformo acidificada. Este método permite, en el orden indicado, la extracción de ARN, ADN y proteínas. El segundo es un método rápido y sencillo basado en el empleo de NaOH, que permite la extracción de una cantidad de ADN menor que los métodos habituales pero suficiente para llevar a cabo ciertos análisis, como los genotipados (Osmundson *et al.*, 2013).

Procedimiento:

Método de la sal de guanidina + solución de fenol:cloroformo acidificada

1) Homogeneización del tejido

- Homogeneizar el tejido en *TRI Reagent* (1 ml/50-100 mg de tejido) empleando métodos de disrupción mecánica como jeringuillas o ULTRA-TURRAX®.
- Incubar el homogeneizado durante 5 min a temperatura ambiente.

2) Separación de fases

- Añadir 200 µl de cloroformo/ml de *TRI Reagent* usado en la homogeneización y agitar vigorosamente durante 15 s.
- Incubar durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 4°C.
- Eliminar la fase acuosa (ARN).

3) Precipitación del ADN

- Añadir 400 µl de etanol 100% por ml de *TRI Reagent* y mezclar por inversión.
- Incubar durante 2-3 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2.000 g durante 5 min a 4°C.

4) Lavado del ADN

- Eliminar el sobrenadante (proteínas)
- Añadir 1 ml de etanol 10% + citrato de sodio 0,1 M y agitar en vórtex.
- Incubar durante 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2.000 g durante 5 min a 4°C.
- Realizar un segundo lavado igual que el anterior.
- Añadir 1 ml de etanol 75% y agitar en vórtex.

- Incubar durante 10-20 min a temperatura ambiente, agitando en vórtex periódicamente.
- Centrifugar a 2.000 g durante 5 min a 4°C.

5) Solubilización del ADN

- Eliminar el etanol de lavado y secar ligeramente el precipitado al aire.
- Resuspender en 300-600 µl de NaOH 8 mM.
- Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4°C.
- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
- Conservar a -20°C.

Método del NaOH

- 1) Añadir a la muestra 100 µl de NaOH 50 mM.
- 2) Incubar durante 10 min a 95°C. Enfriar en hielo.
- 3) Añadir 20 µl de Tris-HCl 1 M (pH 8.0).
- 4) Centrifugar a 12.000 g durante 5-10 min.
- 5) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 6) Conservar a -20°C.

II.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm): Transcripción inversa o retrotranscripción (RT)

La técnica más comúnmente empleada para el estudio del ARNm es la reacción en cadena de la polimerasa (detallada en el siguiente apartado), que utiliza como molde ácidos nucleicos de doble cadena. Por ello, para llevar a cabo estudios de ARNm generalmente se debe proceder a la generación, a partir de él, de un ADN de doble cadena denominado ADN complementario (ADNc). Este proceso que invierte la secuencia normal de los procesos moleculares recibe el nombre de transcripción inversa o retrotranscripción. Para llevar a cabo la retrotranscripción, la primera etapa del proceso consiste en la síntesis de la primera hebra del ADNc mediante la acción enzimática de la transcriptasa inversa sobre el ARNm. Para ello, se utilizan como cebadores los denominados oligo(dT), que se unen a las colas poli(A) del mensajero, así como una mezcla de hexámeros contruidos al azar (*random primers*) que dirigen la retrotranscripción indiscriminada de una mezcla de ARNs. Además, para la reacción serán necesarias la enzima, el tampón de actuación de la enzima con algún cofactor, como el ditioneitol (DTT), un protector del ARN y una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que constituirán la base de la hebra de ADNc.

Procedimiento:

- 1) Para cada muestra preparar la siguiente mezcla:

Muestra (ARN)	0,3-3 µg
Random primers	1 µl
H ₂ O DEPC	Hasta completar un volumen de 13,3 µl

- 2) Incubar durante 5 min a 65°C.

- 3) Añadir 8,85 µl de una mezcla conteniendo:

Tampón o buffer 5x	0,3-1 µg/muestra
dNTPs 10 mM	1 µl/muestra
DTT 100 mM	2,5 µl/muestra
RNAsin	0,15 µl/muestra

- 4) Incubar durante 2 min a 25°C.

- 5) Añadir 1,85 µl de una mezcla conteniendo:

SuperScript II (Invitrogen)	0,5 µl/muestra
H ₂ O DEPC	1,35 µl/muestra

- 6) Incubar durante 10 min a 25°C, seguido de 50 min a 42°C y finalmente 15 min a 70°C.

- 7) Conservar a -20°C.

II.3. Amplificación de ADN o ADNc: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), fue desarrollada en la década de los 80 por Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986) y consiste en la obtención de un gran número de copias de un fragmento de ADN particular partiendo de una cantidad mucho menor del mismo. El proceso requiere el conocimiento previo de dos regiones cortas que flanqueen la zona a amplificar y que reciben el nombre de cebadores (*primers*). La PCR se fundamenta en la propiedad natural de las enzimas ADN polimerasas para generar copias complementarias de hebras de ADN molde empleando ciclos sucesivos de altas y bajas temperaturas. Así, en cada ciclo, las dos cadenas de la doble hélice del ADN comienzan separándose como consecuencia de una alta temperatura (alrededor de 95°C), seguido de lo cual tiene lugar el acoplamiento a estas hebras tanto de los cebadores como de la polimerasa gracias a un descenso de la temperatura hasta alcanzar la temperatura de alineamiento de los cebadores (alrededor de 57-62°C), y finalmente la elongación de las hebras a la temperatura óptima de la polimerasa que se esté empleando (alrededor de 72°C) (**Figura II.1**). Además de ADN molde (ADN o ADNc), los cebadores específicos y una enzima polimerasa (*Taq*), en la PCR intervienen siempre el

tampón de la enzima, Cl_2Mg como cofactor y dNTPs.

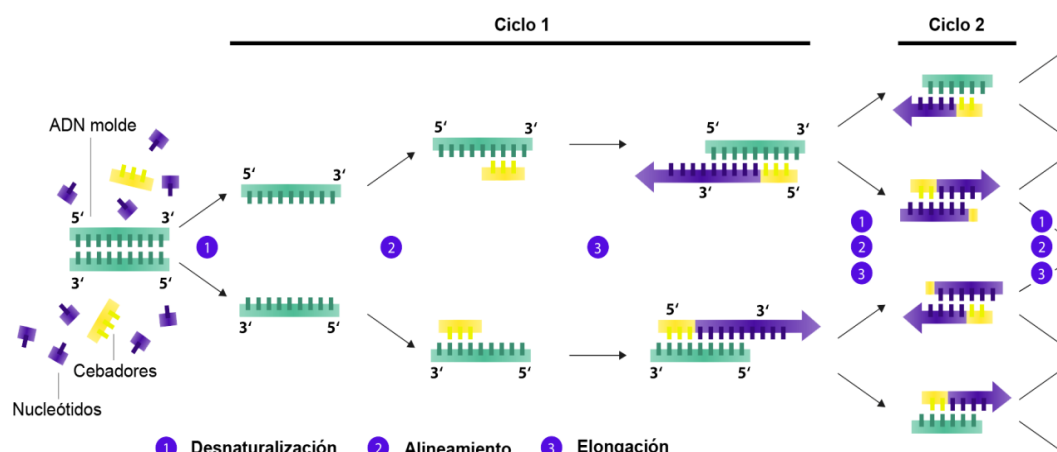


Figura II.1. Esquema del proceso de PCR. En cada ciclo, las dobles cadenas del ADN se desnaturalizan y separan para que se puedan unir a cada hebra los cebadores específicos y la polimerasa y así generar la hebra complementaria, duplicando el número de cadenas de ADN presentes en la muestra. Al final del proceso (30-40 ciclos), se logra una gran amplificación del ADN.

El diseño de los cebadores es un factor muy importante en el éxito de la PCR. La mayoría de los genes estudiados en la presente Tesis Doctoral mediante esta técnica se encuentran clonados en el carpín y el pez cebra y su secuencia está disponible en la base de datos *GenBank*, por lo que los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias específicas de cada especie. Sin embargo, para el clonaje de la secuencia de GOAT del carpín el diseño de los cebadores tuvo lugar a partir de regiones conservadas entre las secuencias génicas del pez cebra y el pez de las cuevas (*Astyanax mexicanus*). En ambos casos, los cebadores se diseñaron empleando la herramienta gratuita de diseño de cebadores disponible en el sitio web del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), y para su diseño se tuvieron en cuenta fundamentalmente tres consideraciones generales: la longitud (entre 18-21 nucleótidos), el contenido de guanina (G) y citosina (C) (aproximadamente del 50%) y la ausencia de formación de horquillas y/o dímeros.

Procedimiento:

1) Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Muestra (ADN o ADNc)	2 µl
Tampón o <i>buffer</i> 10x	10 µl
Cl_2Mg 25 mM	4 µl
dNTPs 10 mM	1-2 µl
Cebadores 10 µM	1-2 µl de cada uno
<i>Taq</i> polimerasa	0,1-0,25 µl
H_2O estéril	Hasta completar un volumen de 25-50 µl

2) Incubar siguiendo el siguiente protocolo:

94°C	_____	3 min	
94°C	_____	30-45 s	} x 30-40 ciclos
55/57/60°C	_____	30-60 s	
72°C	_____	30-60 s	
72°C	_____	5-10 min	

Las variaciones en el volumen final de reacción, las concentraciones de algunos de los componentes y las condiciones de PCR son resultado de buscar ajustar el procedimiento al objetivo perseguido en cada uno de los análisis en los que se empleó esta técnica.

II.4. Cuantificación génica: PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) es una variante de PCR que permite cuantificar la cantidad de copias de ADN que se van generando durante el transcurso del proceso gracias al uso de sistemas de emisión de fluorescencia y de termocicladores especiales que incorporan un detector de la misma y que son capaces de combinar la amplificación y la detección en un solo paso (Wong y Medrano, 2005). En los estudios de RT-qPCR realizados en la presente Tesis, se utilizó un sistema de detección acoplado al fluoróforo *SYBR Green*, denominado así porque presenta su máximo de emisión en la zona de los verdes ($\lambda=522$ nm). Esta molécula se intercala y une al ADN, y en ese estado emite fluorescencia, de manera que a medida que avanzan los ciclos de amplificación y va aumentando la cantidad de ADN aumenta la fluorescencia emitida (Bustin, 2000; Ponchel *et al.*, 2003). El ciclo en el cual la fluorescencia emitida por una muestra es mayor que la fluorescencia basal se denomina ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*) y consiste en una medida inversa de la cantidad de ADN molde que existe de partida, de manera que cuanto más ADN inicial exista, la fluorescencia emitida superará a la fluorescencia basal en un ciclo más temprano (Gibson *et al.*, 1996).

Debido a que el incremento en la fluorescencia se produce de forma lineal en cada ciclo, es posible realizar curvas estándar para asegurar el correcto funcionamiento de la reacción. Estas curvas permiten determinar la cantidad de muestra necesaria en cada reacción y asegurar la linealidad de la misma, y se construyen con una mezcla de ADNc procedente de diferentes muestras de un mismo tejido. En la presente Tesis, dichas curvas se diseñaron variando el volumen de ADNc empleado siguiendo una relación 1:2 ó 1:3. De manera similar, se pueden construir curvas estándar a partir de concentraciones conocidas del gen que se esté midiendo para luego extrapolar en una recta patrón el valor de Ct de una muestra y conocer su concentración, permitiendo así una cuantificación semi-absoluta. Además, este sistema permite monitorizar la temperatura de disociación o fusión del fragmento amplificado con la

adición al final del protocolo de PCR de un paso que incremente la temperatura en intervalos de 0,5°C desde temperaturas de fusión muy bajas (65°C) hasta altas temperaturas (95°C). Este incremento gradual de la temperatura da lugar a la llamada curva de fusión o de *melting*, cuyo perfil viene determinado únicamente por el tamaño de cada fragmento de ADN, permitiendo comprobar la especificidad de la amplificación (Ponchel *et al.*, 2003).

Procedimiento:

- 1) Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

Muestra (ADN o ADNc)	1-2 µl
<i>MasterMix iTaq SYBR Green</i>	5 µl
Cebadores 10 µM	0,4-0,5 µl de cada uno
H ₂ O estéril	Hasta completar un volumen de 10 µl

- 2) Se lleva a cabo el siguiente protocolo:

95°C	_____	30 s	
95°C	_____	5 s	} x 30-40 ciclos
60°C	_____	30 s	
Curva de <i>melting</i> : 65-95°C (+0,5°C/5 s)			

Finalizada la RT-qPCR, se procede a la cuantificación. En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado un método de cuantificación relativa denominado $2^{-\Delta\Delta C_t}$ que se basa en un modelo matemático que compara los valores de C_t de los genes de estudio con los valores de C_t de los genes de referencia (Livak y Schmittgen, 2001). Un gen de referencia es un gen que se expresa de forma constante e independientemente del estado fisiológico de la célula. Los genes *β -actina*, *factor de elongación 1 α* y de la *subunidad ribosomal 18s* se han empleado como genes de referencia en los trabajos de esta Tesis. Para aplicar el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, se calcula en primer lugar la diferencia en el valor de C_t del gen de estudio y el gen de referencia:

$$\Delta C_{t_{\text{muestra}}} = C_{t_{\text{gen estudio}}} - C_{t_{\text{gen referencia}}}$$

A continuación se calcula la diferencia entre el valor de ΔC_t calculado para cada muestra y el ΔC_t del grupo calibrador. Este grupo se utiliza para comparar la diferencia del C_t entre el gen problema y el gen referencia frente a la diferencia del C_t entre el calibrador y el gen de referencia. Normalmente se designa como grupo calibrador al grupo control de un experimento o, si éste no existe, se suele elegir al grupo experimental que presenta la menor expresión del gen de estudio.

$$\Delta\Delta C_{t_{\text{muestra}}} = \Delta C_{t_{\text{muestra}}} - \Delta C_{t_{\text{calibrador}}}$$

Por último, se determina el nivel de expresión del gen de estudio de cada muestra como:

$$\text{Expresión gen de estudio de una muestra} = 2^{-\Delta\Delta C_{t_{\text{muestra}}}}$$

II.5. Obtención de una secuencia génica completa: Amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE) - PCR

La RACE-PCR es una técnica diseñada para conocer los extremos de un ARN (Frohman *et al.*, 1988). Requiere conocer una región interna del ARNm cuya secuencia completa se pretende buscar, de manera que esta región servirá como punto de partida para amplificar, por separado, los extremos 5' y 3'. En la presente Tesis Doctoral, esta técnica fue empleada para la obtención de la secuencia completa del ARNm de la GOAT del carpín.

II.5.1. Amplificación del extremo 3'

Para la amplificación del extremo 3' se utiliza la propiedad natural del ARNm de contener una cola poli(A) en dicho extremo. El proceso conlleva inicialmente la realización de una RT empleando un cebador universal (adaptador) capaz de reconocer y unirse a la cola poli(A) de las moléculas de ARN, de manera que resultan moléculas de ADNc generadas desde el extremo 3' del ARN. A continuación, se realizan dos PCRs consecutivas anidadas (*nested*), utilizando como cebadores 5'-3' dos diseñados en zonas distintas de la región conocida del ADNc, y como cebador 3'-5' uno universal que reconoce al cebador adaptador con el que se llevó a cabo la RT. De este modo se obtiene un gran número de copias de ADNc generadas desde una región conocida hasta el extremo 3', que nos permitirán mediante secuenciación en dirección 5'-3' conocer el extremo en cuestión de la secuencia. Una representación simplificada del proceso se muestra en la **Figura II.2**.

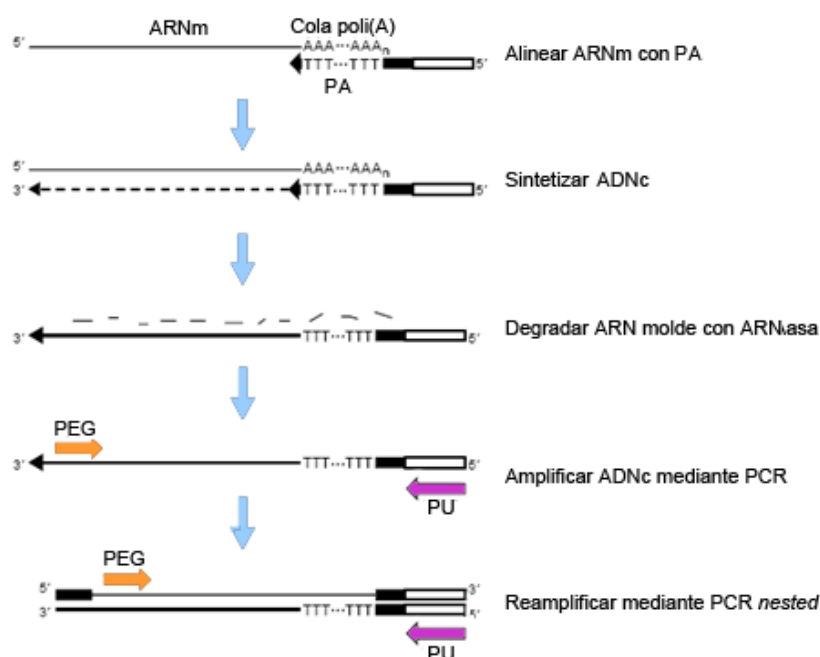


Figura II.2. Representación esquemática del proceso de amplificación del extremo 3' de un ARNm mediante la técnica RACE-PCR. Las flechas naranjas indican los cebadores diseñados a partir de la

secuencia conocida del ADNc. Las flechas violetas representan los cebadores universales. PA, *primer* adaptador; PEG, *primer* específico del gen; PU, *primer* universal.

II.5.2. Amplificación del extremo 5'

El extremo 5' carece de una región constante característica, por lo que la técnica RACE para este extremo requiere un paso previo de adición de una secuencia característica al extremo 5' del ARNm, en este caso una cola poli(C), a través de una reacción enzimática catalizada por una transferasa terminal. A continuación, se lleva a cabo la síntesis del ADNc empleando un cebador universal (adaptador) capaz de reconocer la cola añadida y otro diseñado en la región conocida del gen. Finalmente, se realizan las dos PCRs consecutivas de igual manera que se ha descrito para el extremo 3', con la diferencia de que esta vez el cebador 5'-3' es el universal y los 3'-5' estarán diseñados a partir de la secuencia conocida. La secuenciación en sentido 3'-5' del resultado de las PCRs permitirá conocer la secuencia del extremo buscado. El proceso de amplificación del extremo 5' se muestra simplificado en la **Figura II.3**.

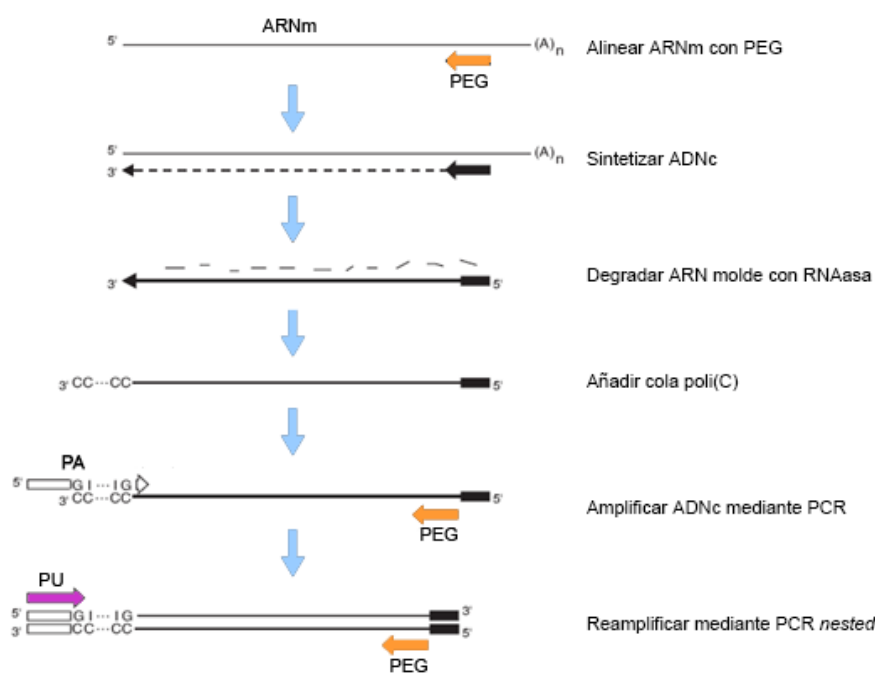


Figura II.3. Representación esquemática del proceso de amplificación del extremo 5' de un ARNm mediante la técnica RACE-PCR. Las flechas naranjas indican los cebadores diseñados a partir de la secuencia conocida del ADNc. Las flechas violetas representan los cebadores universales. PA, *primer* adaptador; PEG, *primer* específico del gen; PU, *primer* universal.

II.6. Separación y visualización de ácidos nucleicos: Electroforesis

La electroforesis es una técnica mediante la cual moléculas que poseen carga eléctrica se desplazan bajo la acción de un campo eléctrico (**Figura II.4**). Tal es el caso de los ácidos

nucleicos y proteínas que, al estar cargados negativamente, en un campo eléctrico migran hacia el ánodo. La velocidad de migración de las moléculas en una electroforesis depende de varios factores, pero el más importante es su tamaño, de forma que esta técnica se utiliza de manera habitual para separar de una manera sencilla fragmentos de ácidos nucleicos o proteínas en función de dicha propiedad (Magdeldin, 2012). La variante de electroforesis de uso más común utiliza como medio de soporte un gel formado por polímeros que forman una malla, matriz o red tridimensional a través de la cual deben avanzar las moléculas de la muestra, que queda embebida en el medio de soporte electroforético.

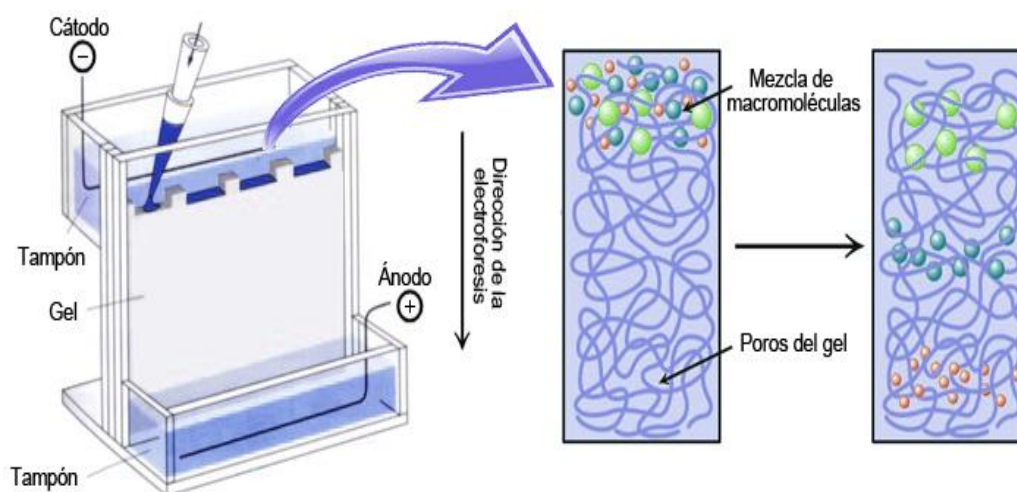


Figura II.4. Representación gráfica del proceso de electroforesis. Al verse sometidas a la acción de un campo eléctrico, las moléculas con carga eléctrica (como los ácidos nucleicos) migran hacia el polo opuesto a una velocidad determinada principalmente por su tamaño.

Para la presente Tesis Doctoral se realizaron tres tipos de electroforesis de ácidos nucleicos que se describen a continuación. En todas ellas, las muestras se mezclaron con un tampón de carga con azul de bromofenol como colorante para visualizar la posición del frente durante la electroforesis, y glicerol para aumentar la densidad de la muestra y asegurar su correcta posición en el fondo del pocillo del gel. En todos los casos se ha empleado como método de tinción el bromuro de etidio, agente intercalante que se introduce entre las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos y emite fluorescencia de color naranja al iluminar con luz ultravioleta (UV). La técnica de electroforesis también ha sido empleada en la presente Tesis para separación de proteínas (descrito en el apartado II.10).

II.6.1. Electroforesis en gel de agarosa/MOPS para visualización de ARN

La electroforesis de ARN se lleva a cabo de manera general para comprobar el estado e integridad del ácido nucleico. Este tipo de electroforesis es de tipo horizontal y se realiza generalmente en entramados de agarosa, polisacárido que se obtiene de algas marinas y que forma geles en medio acuoso a temperatura ambiente, y empleando tampón MOPS (ácido 3-

(N-morfolino)-propanosulfónico). El ARN es una molécula que puede formar extensas estructuras secundarias que impiden la migración estricta en función de su tamaño en estos geles, por lo que se aconseja su desnaturalización previa para que la electroforesis tenga lugar en condiciones óptimas. Para ello, suele utilizarse como agente desnaturalizante el formaldehído que limita la estructura secundaria del ARN.

Procedimiento:

1) Preparación del gel

- Disolver calentando al microondas 1 g de agarosa en 9,2 ml de tampón MOPS 10x y 85,4 ml de H₂O DEPC. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 5,4 ml de formaldehído.
- Verter el gel en la cubeta y dejar polimerizar.

2) Preparación de las muestras

- Para cada muestra preparar la siguiente mezcla:

Muestra (ARN)	1 µl
MOPS 10x	1,2 µl
Formaldehído	3 µl
Tampón de carga 10x	1 µl
Bromuro de etidio (0,33 mg/ml)	1 µl
H ₂ O DEPC	4 µl

- Incubar durante 10 min a 65°C.
- Enfriar en hielo.

3) Electroforesis

- Cargar las muestras en el gel y cubrir con MOPS 1x.
- Correr la electroforesis a 150V (aproximadamente 40 min).

4) Visualización

- Visualizar el gel bajo luz UV.

Lo esperable de una electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes será la obtención de dos bandas claras correspondientes a las subunidades de los ARNs ribosómicos (ARNr) 18S y 28S y una banda un poco más tenue correspondiente a la subunidad 5S del ARNr. Al ser el ARNr el más abundante en la célula (80% del ARN total), cabe esperar que su señal destaque por encima de la emitida por el resto de ARNs, resultando en el único tipo de ARN visible en el gel. Si existe degradación del ARN, apenas se distinguen las tres bandas y, en su lugar, prevalecerá una mancha a lo largo del carril (Figura II.5).

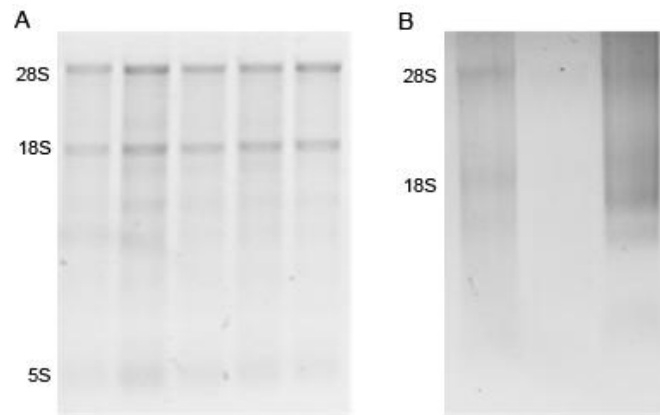


Figura II.5. Electroforesis en gel de agarosa /MOPS para comprobar la integridad del ARN. A) Muestras de ARN en buenas condiciones. Se observan las tres bandas características del ARN ribosómico. B) Muestras de ARN degradado. Apenas se distinguen las bandas de ARNr y, sin embargo hay una mancha que recorre todo el carril, señal inequívoca de degradación del ARN.

II.6.2. *Electroforesis en gel de agarosa/TAE para visualización de ADN*

La electroforesis horizontal en geles de agarosa empleando tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)) constituye el tipo de electroforesis más común para la separación de fragmentos de ADN. En función del tamaño de los fragmentos que se quieran separar y visualizar se emplean geles con diferente porcentaje de agarosa (entre 0,5 y 2% p/v), con mayor porcentaje cuanto menor número de pares de bases tengan los fragmentos.

Procedimiento:

1) Preparación del gel

- Disolver calentando en microondas la cantidad necesaria de agarosa en el volumen necesario de TAE 0,5-1x en función del porcentaje y tamaño del gel. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Añadir 5 µl de bromuro de etidio por cada 50 ml de gel.
- Verter el gel en la cubeta y dejar polimerizar.

2) Preparación de las muestras

- Mezclar el volumen a cargar de cada muestra (ADN) con el volumen necesario de tampón de carga.

3) Electroforesis

- Cargar las muestras en el gel y cubrir con TAE 0,5-1x.
- Correr la electroforesis a 90-120V.

4) Visualización

- Visualizar el gel bajo luz UV.

II.6.3. Electroforesis en gel de acrilamida (PAGE)/TBE para visualización de ADN

Los geles de acrilamida se emplean fundamentalmente para la separación de proteínas, pero también constituyen un soporte habitual para la separación de ADN. La acrilamida presenta un gran intervalo de resolución, siendo capaz de separar moléculas de ADN que difieren en un único par de bases (Wartell *et al.*, 1990). Mientras que los geles de agarosa pueden separar fragmentos de ADN de 200 a 50.000 pares de bases, los geles de acrilamida se usan para fragmentos más pequeños (máximo 1.000 pares de bases). La polimerización de un gel de acrilamida con estructura tridimensional porosa requiere tres componentes fundamentales: bisacrilamida, persulfato amónico (PSA) y tetrametiletilendiamina (TEMED). Las iniciadoras del proceso son las moléculas de PSA, que en disolución se encuentran en forma de radical libre. Estas moléculas son muy activas y son capaces de actuar y transmitir su capacidad de radical libre a las moléculas de acrilamida, que a su vez actúan sobre otras moléculas de acrilamida dando lugar a un polímero lineal. Estas reacciones de polimerización las cataliza el TEMED. La bisacrilamida actúa como agente enlazante. Las electroforesis en geles de acrilamida, a diferencia de los geles de agarosa, son electroforesis de tipo vertical y utilizan como tampón TBE (Tris-Borato-EDTA).

Procedimiento:

1) Preparación del gel

- Preparar una mezcla con los siguientes componentes:

H ₂ O MiliQ	10 ml
Solución de acrilamida/bisacrilamida 30%	8 ml
TBE 10x	2 ml
PSA 10%	120 µl
TEMED	20 µl

- Verter el gel entre los dos cristales de soporte y dejar polimerizar.

2) Preparación de las muestras

- Mezclar el volumen a cargar de cada muestra (ADN) con el volumen necesario de tampón de carga.

3) Electroforesis

- Cargar las muestras en el gel y rellenar la cubeta con TBE 1x.
- Correr la electroforesis a 200V.

4) Visualización

- Sumergir el gel en TAE 1x conteniendo 5 µl de bromuro de etidio.
- Dejar en balanceo durante 20 min.
- Visualizar bajo luz UV.

II.7. Clonación molecular

La clonación molecular o de genes engloba un conjunto de métodos experimentales que tienen como finalidad el ensamblaje de moléculas de ADN y su copiado dentro de organismos receptores. El proceso de clonación (**Figura II.6**) comienza con la purificación del fragmento de ADN que se desea clonar y su inserción en un llamado vector de clonación o de expresión, de tipo plasmídico en la presente Tesis, mediante un proceso denominado ligación. La capacidad de los plásmidos de albergar fragmentos externos de ADN permite la posibilidad de introducir en ellos un gen determinado o un fragmento del mismo (inserto), generando así un ADN recombinante. Posteriormente, por un proceso que recibe el nombre de transformación, el plásmido es insertado nuevamente en una bacteria, que actúa como organismo receptor, y es capaz de replicarse con ella. De esta manera se consigue que el inserto de ADN deseado sea amplificado obteniéndose muchas copias idénticas del mismo de una forma rápida y sencilla; se dice que el trozo de ADN fue clonado. Si se utilizan vectores de expresión, la célula hospedadora será capaz también de expresar el ADN de interés y dar lugar a la proteína en él codificada. A continuación, el ADN plasmídico es extraído y puede ser secuenciado, cortado con enzimas de restricción u otras manipulaciones, según los fines perseguidos (Garbus *et al.*, 2010).

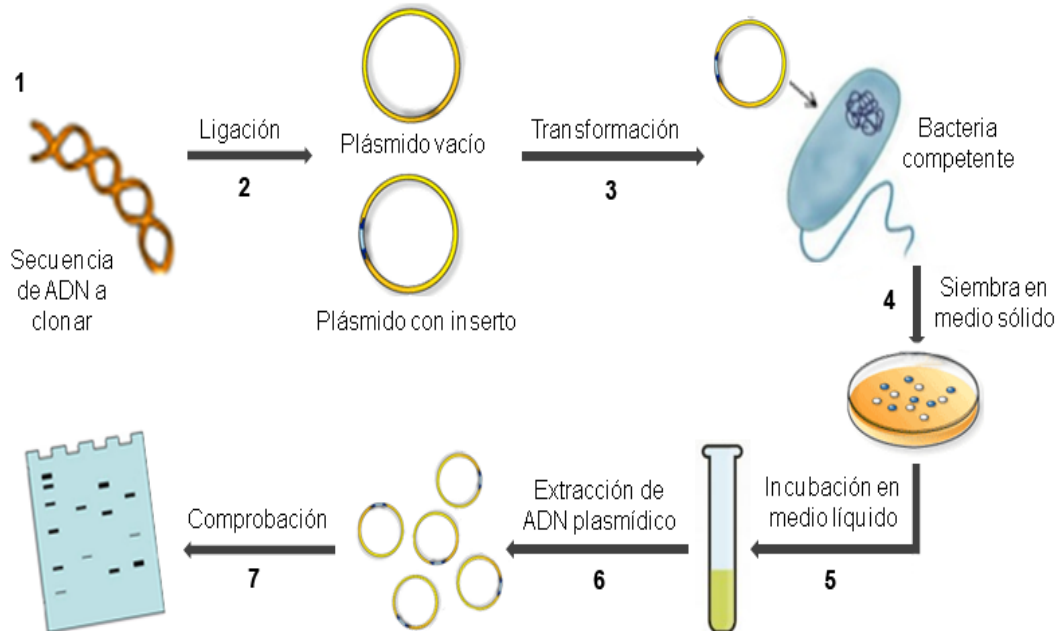


Figura II.6. Resumen esquemático del proceso de clonación molecular o de genes. 1. Se parte de una secuencia purificada de ADNc. 2. Se introduce la secuencia en un vector plasmídico mediante un proceso de ligación. 3. Se transforman bacterias competentes con el producto de la ligación. 4. Se siembran las bacterias transformadas en medio sólido. 5. Se seleccionan algunas colonias aisladas y se incuban en medio de cultivo líquido para aumentar la concentración de plásmido. 6. Se extrae el ADN plasmídico de las colonias aisladas crecidas en medio líquido. 7. Se efectúa una comprobación de la

presencia del inserto en el ADN plasmídico, generalmente por corte con enzimas de restricción y posterior electroforesis.

Este procedimiento de clonación molecular se ha realizado en la presente Tesis Doctoral para la clonación de las distintas secuencias de GOAT que hemos identificado en el carpín con el fin de poder luego transfectarlas en líneas celulares estables a fin de llevar a cabo un estudio funcional de las distintas variantes de la enzima. Los procedimientos posteriores a la clonación aparecen detallados en el Anexo metodológico III. También se han empleado técnicas de clonación molecular durante la técnica de CRISPR/Cas9 (véase Anexo metodológico VI).

II.7.1. Obtención y purificación del ADN a clonar

El primer paso en el proceso de clonación es la obtención de un número elevado de copias del fragmento de ADN que se desea clonar, lo que se consigue llevando a cabo una PCR convencional empleando cebadores que flanqueen la zona de interés (como se ha descrito en el apartado I.3). El producto resultante de esta PCR es luego visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa/TAE para comprobar que presenta el tamaño esperado. Finalmente, aún en los casos en que la PCR haya dado lugar a un único producto de amplificación, es conveniente purificar la muestra antes de proseguir con el proceso de clonación para eliminar posibles restos de reactivos que pudieran interferir con los procedimientos posteriores. La purificación suele llevarse a cabo mediante kits comerciales y puede hacerse directamente a partir del producto de PCR (únicamente en casos de amplificación de un único producto) o a partir de la banda correspondiente extraída del gel de agarosa. El ADN obtenido en este proceso de purificación será el que se emplee para la clonación.

II.7.2. Ligación del ADN (inserto) en un vector plasmídico de expresión

En los procesos de clonación realizados en la presente Tesis Doctoral, el ADN de interés fue ligado al vector plasmídico de expresión pcDNA™3.1/V5-His-TOPO® (Invitrogen) (**Figura II.7**) mediante un método denominado “*TA cloning*”, basado en la propiedad de las enzimas *Taq* polimerasas de añadir una desoxiadenosina a los extremos 5’ del ADN al final de su amplificación por PCR. Aprovechando esta propiedad, los vectores TOPO, que se comercializan linearizados, incorporan una desoxitimina libre en sus extremos 3’ que actúa como extremo cohesivo al inserto de ADN, de manera que la ligación tiene lugar de manera directa gracias a la acción de una topoisomerasa que se encuentra unida al vector. Además, este vector en particular se caracteriza por presentar en su secuencia un

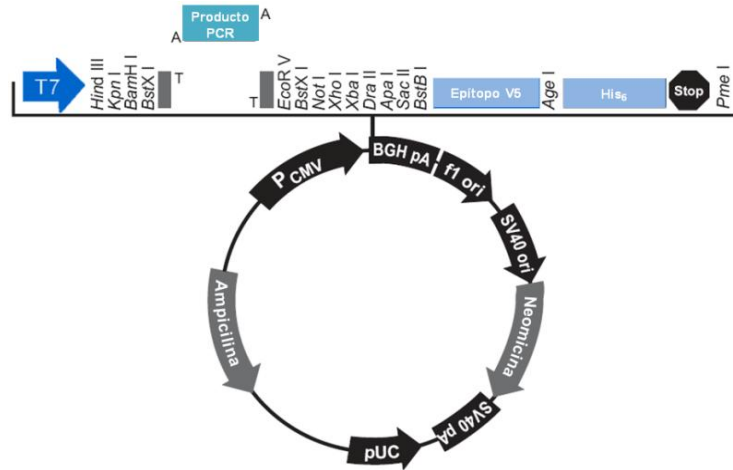


Figura II.7. Esquema del vector plasmídico de expresión pcDNA™3.1/V5-His-TOPO® empleado para el proceso de clonación. En él se muestra, entre otras cosas, el punto de inserción de la secuencia de ADN de interés, así como la localización del promotor, el epítipo V5 y los sitios diana de actuación de enzimas de restricción.

Procedimiento:

- 1) Preparar la siguiente mezcla para cada reacción de ligación:

ADNc (purificado)	4 µl
Solución salina	1 µl
Vector TOPO	1 µl
- 2) Incubar durante 5-30 min a temperatura ambiente.
- 3) Enfriar en hielo.

II.7.3. Transformación de bacterias competentes y cultivo en medio sólido y líquido

La transformación tiene lugar en bacterias que se encuentren en el denominado estado de competencia, en el cual las células presentan alteraciones en su pared y membranas celulares que permiten la entrada en ellas de ácidos nucleicos. En dicho estado, la introducción de ADN exógeno puede tener lugar mediante distintos métodos, entre los cuales en las clonaciones de esta Tesis Doctoral, se ha elegido la transformación por choque térmico. Las bacterias que se han empleado han sido células de *Escherichia coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen). El cultivo de estas células, tanto en condiciones sólidas como líquidas, fue desarrollado en medio Luria Bertani (LB) suplementado con ampicilina para restringir el crecimiento únicamente de colonias que hayan incorporado el plásmido.

Procedimiento: (a realizar en todo momento bajo llama)

Día 1

- 1) Añadir 2 µl de la ligación obtenida en el punto I.6.2 a un vial de células One Shot® TOP10.
- 2) Incubar durante 15-30 min en hielo.
- 3) Dar a las células un choque térmico mediante incubación a 42°C durante 30 s sin agitación. Enfriar inmediatamente en hielo.
- 4) Añadir 250 µl de medio SOC (no frío).
- 5) Incubar durante 60 min a 37°C con agitación (200 rpm).
- 6) Centrifugar a 3.000 g durante 10 min.
- 7) Eliminar 200 µl de sobrenadante y resuspender el pellet en el sobrenadante restante.
- 8) Sembrar la suspensión obtenida en una placa de LB sólido con ampicilina (50 µg/ml).
- 9) Incubar a 37°C hasta el día siguiente.

Día 2

- 1) Seleccionar las colonias aisladas y, con ayuda de una punta de pipeta o palillo estéril, picarlas y pasarlas a un tubo conteniendo 3-5 ml de medio LB líquido con ampicilina (50 µg/ml).
- 2) Incubar a 37°C con agitación (300 rpm) hasta el día siguiente.

Día 3

- 1) Comprobar el crecimiento bacteriano atendiendo a la turbidez del medio de cultivo. Si se desea hacer un cultivo a mayor escala, un pequeño volumen de este cultivo bacteriano o incluso una colonia de las aisladas en placa el día anterior puede crecerse nuevamente en medio LB líquido (de 15 ml a 5 l) con ampicilina (50 µg/ml), como se detalla anteriormente. Se trata de una manera de aumentar el número de bacterias presentes en el cultivo y con ello aumentar la cantidad de ADN bacteriano. En los trabajos de la presente Tesis, este crecimiento a mayor escala se llevó a cabo a partir de cultivos en los que se comprobó que los plásmidos contenidos en las bacterias contenían el inserto de interés (mediante los pasos II.7.4 y II.7.5). Concretamente, se hicieron crecer 0,5 ml de cultivo líquido en 200 ml de LB + ampicilina en un matraz Erlenmeyer de 1 l.
- 2) Proceder a la extracción del ADN plasmídico.

II.7.4. Extracción de ADN plasmídico de cultivo bacteriano: miniprep y maxiprep

La obtención de los plásmidos con la secuencia de estudio inserta requiere finalmente de su extracción de las bacterias. El procedimiento rutinario consistió en la extracción de

ADN plasmídico de cultivos bacterianos a pequeña escala (3-5 ml, descrito en el apartado anterior), proceso que recibe el nombre de *miniprep*. También se realizaron *maxipreps* a partir de los cultivos a mayor escala (200 ml de cultivo). Tanto en las *minipreps* como en las *maxipreps*, en los trabajos de clonación incluidos en esta Memoria se empleó como método de extracción de ADN plasmídico un kit comercial de purificación en columna (Roche). A continuación aparece detallado el procedimiento seguido para las *minipreps*; el procedimiento de las *maxipreps* es el mismo con la diferencia de que emplea mayores volúmenes de reactivos y columnas de mayor tamaño.

Procedimiento:

- 1) Centrifugar 1-4 ml de cultivo bacteriano a 3.000 g durante 10 min.
- 2) Descartar sobrenadante y resuspender pellet en 250 µl de solución de resuspensión celular.
- 3) Añadir 250 µl de solución de lisis celular y mezclar por inversión.
- 4) Incubar durante 4 min a temperatura ambiente.
- 5) Añadir 350 µl de solución de neutralización y mezclar por inversión.
- 6) Incubar durante 5 min en hielo.
- 7) Centrifugar a 12.000g durante 10 min.
- 8) Traspasar sobrenadante a una columna de purificación.
- 9) Centrifugar a 12.000g durante 1 min. Descartar sobrenadante.
- 10) Añadir 500 µl de solución de lavado.
- 11) Centrifugar a 12.000g durante 1 min. Descartar sobrenadante.
- 12) Añadir 500 µl de solución de lavado.
- 13) Centrifugar a 12.000g durante 1 min. Descartar sobrenadante.
- 14) Centrifugar a 12.000g durante 1 min adicional.
- 15) Transferir la columna a un tubo nuevo.
- 16) Añadir 100 µl de solución de elución.
- 17) Eluir ADN plasmídico mediante centrifugación a 12.000g durante 1 min.

II.7.5. Comprobación de la clonación: Tratamiento del ADN plasmídico con enzimas de restricción

Uno de los métodos más frecuentes empleados para la comprobación del correcto funcionamiento del proceso de clonación y de la obtención de un ADN plasmídico que contiene inserto el fragmento de ADN de interés es su tratamiento con enzimas de

restricción. Las endonucleasas de restricción son enzimas capaces de reconocer una secuencia específica de nucleótidos en una molécula de ADN y cortar las dos cadenas de la molécula en ese punto, al que se denomina sitio o diana de restricción. El mecanismo de corte de ADN se produce a causa de la ruptura de dos enlaces fosfodiéster en la doble hebra, lo que da lugar a dos extremos de ADN que pueden ser romos o cohesivos, según el mecanismo de acción de cada enzima. Estos últimos tienen tendencia a volver a unirse, ya sea entre sí o con otros extremos coincidentes que existan en la cercanía, lo que tiene importantes aplicaciones en la biología molecular.

En los procesos de clonación realizados en la presente Tesis, el tratamiento del ADN plasmídico con enzimas de restricción se ha llevado a cabo mediante el empleo de enzimas capaces de cortar el plásmido a ambos lados del lugar de inserción del inserto, liberándolo por completo, o de enzimas que cortan a un único lado del lugar de inserción del inserto y dentro del mismo, liberando únicamente un fragmento de inserto. En ocasiones las secuencias del plásmido y/o inserto presentan sitios de reconocimiento que permiten los cortes deseados para una misma enzima, mientras que en otras se requiere la acción conjunta de dos de ellas. Las enzimas de restricción que se han empleado han sido EcoRI y EcoRV para los vectores conteniendo ghrelina, y BamHI para la GOAT. Tras la digestión con estas enzimas, la realización de una electroforesis en gel de agarosa/TAE de los productos resultantes de la misma y la comprobación del patrón de bandas obtenido permitirá comprobar la identidad del fragmento de ADN inserto en el plásmido. También se puede proceder a secuenciar el ADN plasmídico para una comprobación más precisa.

Procedimiento:

- 1) Preparar la siguiente mezcla para cada reacción de digestión enzimática:

ADN plasmídico	3 µl
Tampón o <i>buffer</i> 10x	2 µl
Enzima/s de restricción	1 µl (0,5 µl de cada una en caso de dos)
H ₂ O estéril	14 µl
- 2) Incubar a 37°C una hora o hasta el día siguiente.
- 3) Correr las muestras en un gel de agarosa/TAE para comprobar el patrón de bandas resultante de la digestión.

II.8. Extracción de proteínas

En el presente trabajo, se ha recurrido a la extracción de proteínas totales tanto de células en cultivo (véase Anexo metodológico III) como de muestras de tejidos, protocolos que se detallarán por separado. En ambos casos, la extracción de proteínas ha implicado en

primer lugar la lisis celular mediante un método químico basado en la utilización de detergentes, moléculas anfipáticas que se incorporan a la membrana celular y solubilizan los lípidos y proteínas presentes en la misma creando poros que terminan por provocar la lisis completa.

II.8.1. Extracción de proteínas a partir de células en cultivo

Para la lisis celular se eligió el detergente no-iónico Tritón X-100 que causa una lisis celular más lenta que otros detergentes más agresivos, pero tiene una tendencia menor a desnaturalizar las proteínas y romper los complejos proteicos (Brown y Audet, 2008). Este detergente fue empleado en un tampón HEPES (ácido 4-(-2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico)-NaCl-EDTA que, tras la lisis, se encarga de solubilizar las proteínas. Además, como tras la rotura celular rápidamente se desencadenan procesos de proteólisis, desfosforilación y desnaturalización proteica, se añadieron a la solución de lisis inhibidores de proteasas y fosfatasa, que reducen considerablemente dichos procesos, protegiendo a las proteínas.

Procedimiento:

- 1) Retirar el medio de cultivo de cada pocillo por aspiración.
- 2) Lavar con tampón fosfato salino (PBS) 1x (Opcional). Retirar por aspiración.
- 3) Añadir a cada pocillo 100-200 µl de solución de lisis preparada con los siguientes componentes:

H2O libre de ARNasas	7,1 ml
HEPES 1 M	500 µl
NaCl 5 M	200 µl
EDTA 0,5 M	200 µl
Tritón X-100	100 µl
Ortovanadato sódico 100 mM	200 µl
Pirofosfato sódico 230 mM	170 µl
Fluoruro sódico 1 M	100 µl
Inhibidor de proteasas 7x	1430 µl

- 4) Proceder a la lisis de las células mediante pipeteo sucesivo o con ayuda de un raspador de células.
- 5) Recoger el lisado en un tubo nuevo.
- 6) Incubar durante 15 min a 4°C en agitación.
- 7) Centrifugar a 12.000g durante 15 min a 4°C.
- 8) Transferir sobrenadante (extracto proteico) a un tubo nuevo.
- 9) Conservar a -80°C.

II.8.2. Extracción de proteínas a partir de tejidos

Para la extracción de proteínas a partir de muestras de tejidos se ha empleado el reactivo comercial T-PER (Thermo Scientific), que permite una extracción suave de las proteínas totales presentes en la muestra. Este reactivo de lisis de células de tejidos utiliza un detergente en bicina 25 mM y cloruro sódico 150 mM. Al igual que en la extracción de proteínas a partir de células, al reactivo de lisis se le añadió una mezcla de inhibidores de proteasas y EDTA (inhibidor de metaloproteasas) para evitar la degradación proteolítica durante la lisis celular y la extracción de proteínas.

Procedimiento:

- 1) Homogeneizar el tejido en T-PER suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas y EDTA (1 ml por cada 50 mg de tejido), empleando métodos de disrupción mecánica como jeringuillas o ULTRA-TURRAX®.
- 2) Incubar durante 30-120 min a 4°C en agitación.
- 3) Centrifugar a 10.000g durante 5 min a 4°C.
- 4) Transferir sobrenadante (extracto proteico) a un tubo nuevo.
- 5) Conservar a -80°C.

II.9. Cuantificación de proteínas

Los ensayos colorimétricos constituyen los métodos más habituales de cuantificación de la cantidad total de proteínas de una muestra, y se basan en las reacciones que se producen entre las proteínas de la muestra y los reactivos de detección. Los ensayos de este tipo más empleados son los métodos de Lowry, Bradford y del ácido bicinonínico (BCA). En los estudios realizados en la presente Tesis se han empleado los métodos del BCA (para la cuantificación de proteínas extraídas a partir de células en cultivo) y de Bradford (para la cuantificación de proteínas extraídas a partir de tejidos). En todos estos métodos, la determinación de la concentración de proteínas totales en una muestra requiere la realización de una curva estándar en cada ensayo construida a partir de concentraciones crecientes conocidas de proteína pura. El estándar utilizado con mayor frecuencia es la albúmina de suero bovino (BSA), aunque se puede utilizar cualquier proteína producida en el laboratorio o disponible comercialmente.

II.9.1. Método del BCA

El método del BCA, sal sódica, se basa en la reducción de iones Cu^{2+} a Cu^{1+} que tiene lugar en medio alcalino como consecuencia de la interacción de los mismos con las proteínas

(reacción de Biuret) y la posterior unión del BCA a los iones Cu^{1+} formando complejos de color púrpura que pueden ser medidos espectrofotométricamente (Walker, 2002).

Procedimiento:

Se describe el proceso seguido para la cuantificación de proteínas basada en el método del BCA empleando un kit comercial (Thermo Scientific), que presenta una sensibilidad de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y un rango de linealidad entre 20-2.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

- 1) Pipetear las muestras a cuantificar y la curva estándar en una placa de 96 pocillos atendiendo a la siguiente tabla:

Tipo de muestra	[Proteína] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Volumen BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (μl)	Volumen muestra (μl)	Volumen solución de lisis (μl)	Vol H_2O (μl)
Std 1	0	0	-	5	20
Std 2	1	1	-	5	19
Std 3	2	2	-	5	18
Std 4	5	5	-	5	15
Std 5	10	10	-	5	10
Std 6	15	15	-	5	5
Std 7	20	20	-	5	0
Muestra	¿?	-	5	-	20

- 2) Mezclar los reactivos A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, BCA y tartrato sódico en hidróxido sódico 0,1 M) y B (4 % sulfato de cobre) con la siguiente relación:

Volumen de reactivo A (μl): cantidad de pocillos x 200

Volumen de reactivo B (μl): volumen reactivo A / 50

- 3) Añadir a cada pocillo 200 μl de la mezcla de reactivos.
- 4) Incubar durante 15-30 min a 37°C.
- 5) Leer absorbancia a 540 nm.

II.9.2. Método de Bradford

Este método se basa en la unión a las proteínas de un colorante, Coomassie Blue G-250, el cual existe en tres formas: catiónica (rojo), neutral (verde) y aniónica (azul). En condiciones ácidas, la forma predominante en que se encuentra dicho colorante es la roja; sin embargo, cuando se une a proteínas se convierte en su forma azul, de mayor coeficiente de extinción y que es detectada espectrofotométricamente (Bradford, 1976).

Procedimiento:

Se detalla el procedimiento seguido para la cuantificación de proteínas mediante el

método de Bradford empleando un kit comercial (Bio-Rad), que presenta un rango de linealidad entre 50-500 µg/ml.

- 1) Preparar una curva estándar de BSA partiendo de una solución madre de concentración 2 mg/ml y realizando al menos 5-6 diluciones seriadas.
- 2) Pipetear 10 µl de cada estándar así como de las muestras a cuantificar en una placa de 96 pocillos.
- 3) Añadir a cada pocillo 250 µl del reactivo colorante.
- 4) Incubar durante 5 min a temperatura ambiente.
- 5) Leer absorbancia a 595 nm.

II.10. Detección de proteínas: Electrotransferencia, inmunoblot o *Western blot*

La electrotransferencia o inmunoblot, más conocida por su nombre en inglés *Western blot*, es una técnica analítica ampliamente utilizada para el estudio de proteínas descrita por primera vez en 1979 (Towbin *et al.*, 1979). Consiste en un sistema muy sensible que permite la detección de una o varias proteínas específicas en una muestra biológica basándose en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo (de la Fuente González *et al.*, 2007).

El proceso de *Western blot* se muestra esquematizado en la **Figura II.8** (de la Fuente González *et al.*, 2007; Gallagher *et al.*, 2011). Comienza con la separación de las proteínas presentes en una muestra mediante electroforesis en un sistema dodecil-sulfato sódico (SDS)-PAGE. Se emplea una electroforesis discontinua, caracterizada por la utilización de dos tipos de geles: 1) un gel de separación (inferior), compuesto por un porcentaje de acrilamida que se elige en función del tamaño de la/s proteína/s que se desea separar y tampón Tris/HCl de pH 8,8, y 2) un gel de concentración o *stacking* (superior), de porcentaje de acrilamida del 4% y tampón Tris/HCl de pH 6,8. Este sistema de doble gel permite que todas las proteínas de una muestra comiencen el proceso de separación a la vez y en el mismo punto del gel (Laemmli, 1970). Además, puesto que se trabaja con tampones que tienen diferentes pH y las proteínas ven afectada su carga en función de este parámetro, en principio el efecto que tendría el pH en la carga de las proteínas de una mezcla compleja de macromoléculas sería desconocido. Por esta razón, la mayoría de las electroforesis para *Western blot* se realizan en condiciones desnaturalizantes (Chakavarti y Chakavarti, 2008). El agente desnaturalizante más empleado en esta técnica es el detergente aniónico SDS, el cual no sólo se une y despliega a la proteína sino que le confiere una carga negativa prácticamente uniforme a lo largo de la longitud de la cadena peptídica. El SDS se añade tanto como componente de los dos tipos de

geles como en el tampón de carga de muestras. Este último suele contener también el agente reductor β -mercaptoetanol, que completa la linearización de la proteína al romper los puentes disulfuro de la misma.

Tras la electroforesis, se realiza una transferencia cuantitativa e irreversible de todas las proteínas presentes en la muestra a una membrana, generalmente de nitrocelulosa o de fluoruro de polivídeno. La membrana es un soporte sólido que une e inmoviliza las proteínas, permitiendo así que la hibridación de un anticuerpo las pueda detectar. La mayoría de los sistemas de transferencia utilizan la generación de un campo eléctrico para conducir a las proteínas desde el electrodo negativo al positivo (Gibbons, 2014). En la presente Tesis se ha empleado un sistema de transferencia semiseco que tiene lugar en horizontal y entre papeles de filtro saturados en tampón de transferencia. Frente al sistema de transferencia húmedo tradicional, este sistema reduce la cantidad de tampón necesario y además permite transferencias considerablemente más rápidas debido a que en él los electrodos se encuentran más próximos (Laurière, 1993). La eficacia de una transferencia puede comprobarse mediante la tinción de la membrana con solución rojo Ponceau, que permite una tinción rápida y reversible de las proteínas. De igual manera, la tinción con azul Coomassie puede utilizarse para la tinción del gel una vez realizada la transferencia para comprobar los residuos de proteína en el mismo.

Una vez las proteínas se encuentran en la membrana tiene lugar la hibridación de los anticuerpos que permitirán el reconocimiento específico de la/s proteína/s de interés. Esto debe ir precedido de un paso de bloqueo de la membrana que tiene como finalidad la reducción de los lugares de unión inespecíficos de las proteínas al anticuerpo. Las soluciones más habituales de bloqueo consisten en soluciones a base de proteínas, como la leche desnatada en polvo o el BSA. Una vez bloqueada, la membrana se incuba con el anticuerpo primario (monoclonal o policlonal) específico del antígeno que se desea reconocer. En general, los anticuerpos reconocen una secuencia de aminoácidos pequeña (epítipo) que queda expuesta al eliminar la estructura tridimensional de la proteína en condiciones desnaturizantes y reductoras.

En último lugar, se procede a la detección de la/s proteína/s de interés, proceso comúnmente denominado revelado. Si bien el anticuerpo primario puede encontrarse conjugado con un sistema de marcaje detectable, como una enzima, biotina o molécula fluorescente, lo más habitual es la detección mediante un sistema indirecto que utiliza un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) contra la especie del primer anticuerpo. En la detección indirecta, es el anticuerpo secundario el que está conjugado con un marcaje

detectable. Entre los métodos de detección de marcajes de anticuerpos, el más empleado y el utilizado en esta Tesis es la quimioluminiscencia, que utiliza comúnmente anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP). Esta enzima, en una reacción de múltiples etapas, cataliza la oxidación del luminol dando lugar a una reacción luminosa cuya intensidad y duración resultan incrementadas en gran medida en presencia de potenciadores químicos y catalizadores, en un proceso conocido como quimioluminiscencia mejorada (ECL). El máximo de luz de emisión se produce a una longitud de onda de 425 nm y puede ser detectado por una cámara con un dispositivo de carga acoplada o por corta exposición a una película de rayos X (Mruk y Cheng, 2011).

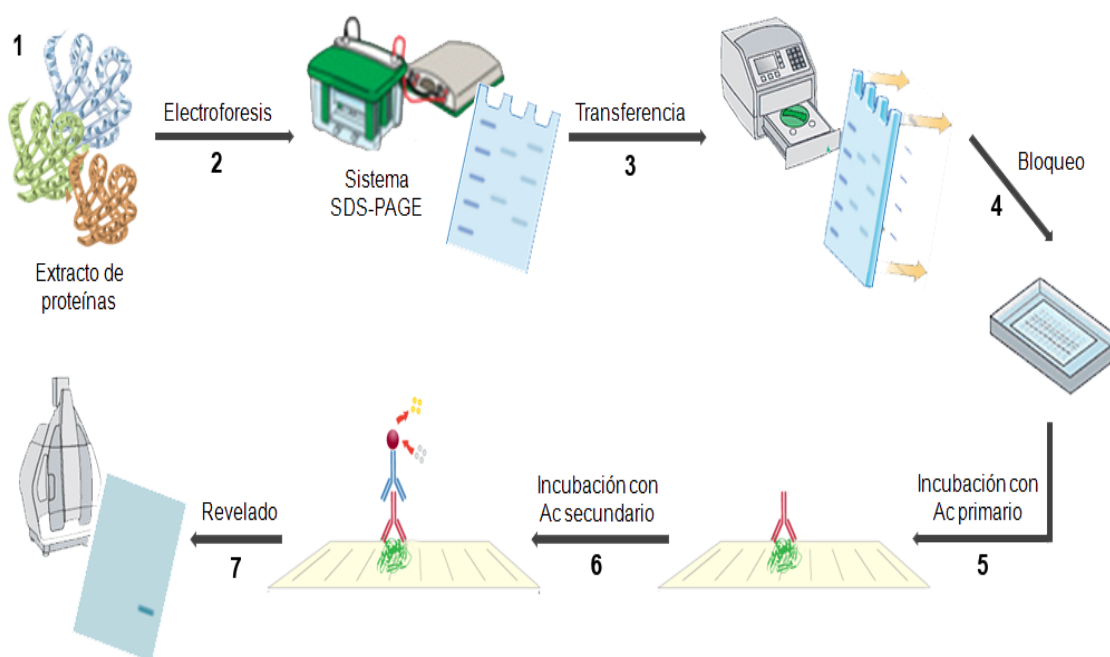


Figura II.8. Resumen esquemático del proceso de *Western blot*. 1. Se parte de una mezcla de las proteínas totales presentes en una muestra. 2. Las proteínas se separan en función de su tamaño mediante electroforesis en sistema SDS-PAGE. 3. Se transfieren las proteínas desde el gel a una membrana. 4. Se bloquean los sitios de unión inespecíficos de las proteínas a anticuerpos. 5. Se incuba con el anticuerpo primario capaz de reconocer la proteína de interés. 6. Se incuba con un anticuerpo secundario que permita la detección del anticuerpo primario. 7. Se procede al revelado de la membrana para detectar la proteína de interés.

En la presente Tesis Doctoral, la técnica de *Western blot* fue empleada para la detección de enzimas digestivas, transportadores de glucosa y hormonas gastrointestinales en muestras de intestino anterior e hígado del carpín, para lo cual se emplearon anticuerpos dirigidos frente a cada una de las proteínas de estudio. Además, se ha hecho uso de *Western blot* para la visualización de la posible proteína codificada por las distintas variantes de *splicing* identificadas para la GOAT de carpín. En el último caso, el estudio ha empleado un sistema *in vitro* de cultivo celular y la detección de las proteínas se llevó a cabo empleando un

anticuerpo capaz de reconocer específicamente el epítipo V5 presente en el vector plasmídico de expresión en cual las secuencias fueron transfectadas en las líneas celulares de estudio (véase Anexo metodológico III).

Procedimiento:

1) Electroforesis SDS-PAGE

Preparación de los geles

- Preparar el gel de separación conteniendo los siguientes componentes:

	10%	12%	15%
H ₂ O MiliQ	3,9 ml	3,4 ml	2,5 ml
Solución de acrilamida/bisacrilamida 30%	3,3 ml	4 ml	5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl	100 µl
PSA 10%	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

- Verter el gel entre los dos cristales de soporte, cubrir el borde con 1 ml de isopropanol o isobutanol y dejar polimerizar.

- Preparar el gel de concentración conteniendo los siguientes componentes:

	4%
H ₂ O MiliQ	3 ml
Solución de acrilamida/bisacrilamida 30%	650 µl
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	1,25 ml
SDS 10%	50 µl
PSA 10%	25 µl
TEMED	5 µl

- Eliminar el isopropanol o isobutanol, verter el gel por encima del gel de separación y dejar polimerizar.

Preparación de las muestras

- Mezclar 30-50 µg de proteínas de cada muestra con el volumen necesario de tampón de carga.
- Incubar durante 10 min a 95°C para desnaturalizar las proteínas (este paso se ha omitido en algunos *Western blot* de estudio de la proteína GOAT por si pudiese interferir negativamente en su detección).
- Enfriar en hielo.

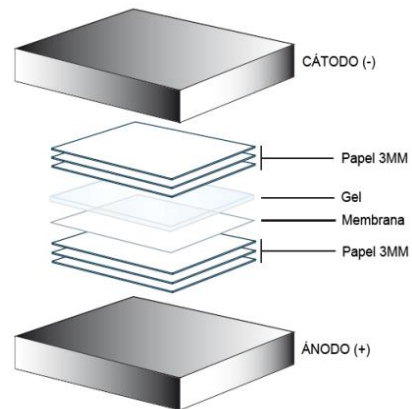
Electroforesis

- Cargar las muestras en el gel y rellenar la cubeta con tampón de migración o *running* 1x (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1% SDS, pH 8.3)
- Correr la electroforesis a 30-50V hasta que las muestras alcancen el final del gel de concentración; luego a 130-150V.

2) Transferencia (Sistema *Trans-Blot*, Bio-Rad)

- En uno de los compartimentos del aparato colocar en su base (ánodo) los siguientes elementos en el orden indicado:

- Dos o tres papeles whatman 3MM impregnados en tampón de transferencia 1x (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3)
- Membrana previamente activada en H₂O MiliQ (2 min) y tampón de transferencia 1x (5 min)
- Gel de electroforesis
- Dos o tres papeles whatman 3MM impregnados en tampón de transferencia 1x



- Eliminar las posibles burbujas y cerrar el compartimento con la tapa superior (cátodo).
- Someter a corriente constante de 1,3A durante 10 min.
- Comprobar la eficacia de la transferencia sumergiendo la membrana en solución rojo Ponceau (0,5% rojo Ponceau, 1% ácido acético glacial) durante 1 min. Desteñir con agua destilada.

3) Bloqueo de uniones inespecíficas

- Sumergir la membrana en solución de bloqueo (5% leche desnatada en polvo en tampón tris salino (TBS) 1x-0,1% Tween-20 ó 1% BSA en TBS 1x-0,1% Tween-20).
- Incubar durante 45-60 min a temperatura ambiente en balanceo.

4) Incubación con anticuerpo primario

- Sumergir la membrana en solución de anticuerpo primario disuelto en solución de bloqueo (en el caso de los trabajos de la presente Tesis: relación 1:500, excepto para la proteína vinculina que se usó una relación 1:1.000).
- Incubar durante 60 min a temperatura ambiente en balanceo o a 4°C hasta el día siguiente.

5) Lavado

- Realizar tres lavados de la membrana con TBS 1x-0,1% Tween-20 de 5 min cada uno.

6) Incubación con anticuerpo secundario

- Sumergir la membrana en solución de anticuerpo secundario (conjugado con HRP) disuelto en TBS 1x-0,1% Tween-20 (en el caso de los trabajos de la presente Tesis: relación 1:3.000, excepto para la proteína vinculina que se usó una relación 1:10.000).
- Incubar durante 60 min a temperatura ambiente en balanceo.

7) Lavado

- Realizar cuatro lavados de la membrana con TBS 1x-0,1% Tween-20 de 10-15 min cada uno.

8) Revelado por quimioluminiscencia

- Cubrir la membrana con una mezcla 1:1 de los reactivos A y B ("*Pierce ECL Western Blotting Substrate*", Thermo Scientific).
- Visualizar mediante película de rayos X o de forma digital utilizando una cámara CCD.

II.11. Bioinformática

La bioinformática consiste en la aplicación de tecnologías computacionales a la recopilación, almacenamiento, organización, análisis y manipulación de datos biológicos. Hoy en día, las tecnologías bioinformáticas son muy numerosas y constituyen herramientas de valiosa utilidad para el análisis de innumerables aspectos dentro de la investigación biológica. En la presente Tesis Doctoral se ha hecho uso de diversas herramientas bioinformáticas dirigidas principalmente al análisis y comparación de secuencias génicas, el estudio de sus relaciones filogenéticas, y a la predicción de estructuras de secuencias proteicas. Las principales herramientas empleadas se indican a continuación.

II.11.1. Alineamiento de secuencias: *Clustal Omega* y *BLAST*

El alineamiento de secuencias es una herramienta fundamental para numerosos métodos de análisis de secuencias. El *software* para el cálculo de alineamientos pareados y múltiples más utilizado, empleado en la presente Tesis, es el *Clustal Omega* (Sievers y Higgins, 2014), que calcula el alineamiento local óptimo entre dos secuencias génicas o proteicas en base al algoritmo de Smith y Waterman (1981). En caso de alineamientos múltiples, el *Clustal Omega* es un programa de alineamiento progresivo, es decir, primero calcula alineamientos pareados de todas las secuencias a alinear y con ellos calcula un árbol guía que define en qué orden se van a ir añadiendo las secuencias al alineamiento múltiple de manera progresiva. El *Clustal Omega* es un *software* de uso libre, disponible a través del siguiente enlace: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

Cuando se desea comparar una secuencia problema (o *query*) contra la totalidad de secuencias depositadas en bases de datos, se hace uso comúnmente de la herramienta denominada *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*, Altschul *et al.*, 1997), que realiza millones de alineamiento y devuelve los más relacionados con la secuencia problema. Esta herramienta se basa también en el algoritmo de Smith y Waterman (1981) para realizar sus

alineamientos y usa una matriz de sustitución de aminoácidos o nucleótidos para calificarlos. *BLAST* puede usarse gratuitamente desde el servidor del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI): <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

II.11.2. Construcción de árboles filogenéticos: *MEGA6*

Una de las principales aplicaciones del alineamiento de secuencias múltiple es el estudio de la filogenia de un grupo de secuencias u organismos. Esto se realiza a través de la creación de árboles filogenéticos que muestran una hipótesis evolutiva de un conjunto de genes, especies u otros taxones. Entre los diferentes métodos existentes para la creación de árboles filogenéticos, en la presente Tesis se han empleado métodos basados en distancias, que permiten construir árboles filogenéticos en base a la distancia genética entre parejas de secuencias de ADN o proteínas, requiriendo por tanto un alineamiento múltiple como información de entrada. Dentro de estos métodos, se ha elegido el denominado método *Neighbor-joining*, basado en el criterio de mínima evolución: el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de las ramas internas (Saitou y Nei, 1987). El programa informático que se ha empleado para la creación de árboles filogenéticos es el programa *MEGA6* (Tamura *et al.*, 2013).

II.11.3. Análisis de propiedades físico-químicas de proteínas: *ProtParam*

ProtParam es una herramienta del servidor de proteómica *Expasy* (*Expert Protein Analysis System*) del Instituto suizo de Bioinformática que permite el cálculo de diversos parámetros físicos y químicos de una proteína, ya sea almacenada en una base de datos o introducida por el usuario. Los parámetros calculados incluyen el peso molecular, el punto isoelectrico teórico, la composición de aminoácidos, la composición atómica, el coeficiente de extinción, la vida media estimada, el índice de inestabilidad, el índice alifático y el promedio general de hidropatía. Esta herramienta es de uso libre a través del siguiente enlace: <http://web.expasy.org/protparam/>.

II.11.4. Predicción de la existencia de péptido señal dentro de una secuencia proteica: *SignalP 4.1*

Otro parámetro que resulta de gran interés en el estudio de una proteína es conocer si presenta un péptido señal capaz de decidir su destino, ruta de transporte y eficacia de secreción. En la presente Tesis, se ha empleado para este fin el servidor *SignalP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), capaz de predecir no sólo la presencia de un péptido señal dentro de una secuencia de aminoácidos sino también la localización del sitio

de corte de dicho péptido. El método se basa en una combinación de varias redes neuronales artificiales capaces de realizar una predicción teniendo en cuenta las características físico-químicas que caracterizan a los péptidos señal (Petersen *et al.*, 2011).

II.11.5. Predicción de la topología de las proteínas de membrana: *MemBrain*

La predicción de la estructura tridimensional de una proteína desde su secuencia de aminoácidos proporciona valiosa información acerca de la topología de una proteína de una manera rápida y sencilla. Actualmente, existen numerosos métodos computacionales de predicción de topología basados fundamentalmente en la escala hidrofóbica de los aminoácidos o en aproximaciones estadísticas. En la presente Tesis, las predicciones de topología se han realizado empleando el servidor *MemBrain*, que integra además una serie de enfoques bioinformáticos modernos que permiten predicciones más precisas (Shen y Chou, 2008). Esta herramienta es de uso libre a través del enlace: <http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/MemBrain/>.

Bibliografía

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25: 3389-3402.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brown RB, Audet J (2008) Current techniques for single-cell lysis. *J R Soc Interface* 5: S131-S138.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-193.
- Chakavarti B, Chakavarti D (2008) Electrophoretic separation of proteins. *J Vis Exp* 16: 758.
- Chomczynski P, Sacchi M (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- de la Fuente González A, Rodríguez Lozano J, Fonseca Capdevila E (2007) Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia. *Piel* 22: 252-258.

- Frohman MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 8998-9002.
- Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JGR (2011) Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Cell Biol* Supl 54, Unidad 6.2: 1-58.
- Garbus I, Gómez M, Echenique V (2010) Herramientas de ingeniería genética. En: *Biotecnología y mejoramiento vegetal II* (G Levitus, V Echenique, C Rubinstein, E Hopp y L Mroginski, eds), ArgenBio, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. pp. 47-69.
- Gibbons J (2014) Western blot: protein transfer overview. *N Am J Med Sci.* 6: 158-159.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 6: 995-1001.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Laurière M (1993) A semidry electroblotting system efficiently transfers both high- and low-molecular-weight proteins separated by SDS-PAGE. *Anal Biochem* 212: 206-211.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Magdeldin S (2012) *Gel electrophoresis – Principles and basics* (S Magdeldin, ed). InTech, Rijeka, Croacia. 376 pp.
- Mruk DD, Cheng CY (2011) Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine immunoblotting: an inexpensive alternative to commercially available kits. *Spermatogenesis* 1: 121-122.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- Osmundson TW, Eyre CA, Hayden KM, Dhillon J, Garbelotto MM (2013) Back to basics: an evaluation of NaOH and alternative rapid DNA extraction protocols for DNA barcoding, genotyping, and disease diagnostics from fungal and oomycete samples. *Mol Ecol Resour* 13: 66-74.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-786.
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell A *et al.* (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I

- fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol* 3: 18.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tress. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Shen H, Chou JJ (2008) MemBrain: improving the accuracy of predicting transmembrane helices. *PLoS ONE* 3: e2399.
- Sievers F, Higgins DG (2014) Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics* 48: 1-16.
- Smith T, Waterman M (1981) Identification of common molecular subsequences. *J Mol Biol* 147: 195-197.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354.
- Walker JM (1994) The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantification. *Methods Mol Biol* 32: 5-8.
- Wartell RM, Hosseini SH, Moran CP Jr (1990) Detecting base pair substitutions in DNA fragments by temperature-gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 18: 2699-2705.
- Wong ML, Medrano JF (2005) Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* 39: 75-85.

ANEXO METODOLÓGICO III

CULTIVOS CELULARES

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, manteniendo en el mayor grado posible sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Esto requiere, de forma general, su mantenimiento en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas, de manera que todas sus funciones metabólicas se mantienen de una manera semejante a las que presentaban en su medio natural (Freshney, 2010). Los primeros logros usando técnicas de cultivo celular se remontan al año 1885 con los trabajos de Wilhelm Roux, aunque se considera al zoólogo americano Ross G. Harrison como el iniciador de los cultivos de tejidos animales por ser el primer científico en emplear técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo* (Harrison *et al.*, 1907). En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia variedad de tejidos y organismos, y los cultivos celulares son una herramienta de enorme utilidad en distintas disciplinas científicas.

En función del grado de preservación de la estructura del tejido u órgano de origen, los cultivos celulares se pueden clasificar en tres tipos principales (Freshney, 2010; **Figura III.1**). Los cultivos de órganos o tejidos implican el cultivo de un órgano o tejido en su totalidad con el fin de retener, en la mayor medida posible, la arquitectura característica que presentaba *in vivo*. Este tipo de cultivos no permite la multiplicación celular. Los cultivos de explantes primarios consisten en el cultivo de fragmentos de tejidos o de órganos. En ellos las células se adhieren en distinto grado a la superficie de cultivo y las de la periferia del explante pueden migrar y proliferar. Por último, los cultivos celulares propiamente dichos implican que las células de un tejido, o las resultantes del crecimiento de un explante primario, se dispersan en una suspensión de células individuales que se pueden cultivar en forma de una monocapa adherente en un sustrato sólido o en suspensión en el medio de cultivo. En éstos las células tienen, en la mayoría de los casos, una gran capacidad de proliferación y la población celular crece notablemente (Freshney, 2010). Las técnicas de cultivos celulares, en todas sus variedades, presentan grandes ventajas que las han convertido en herramientas de trabajo cada vez más empleadas tanto en investigación básica como aplicada.

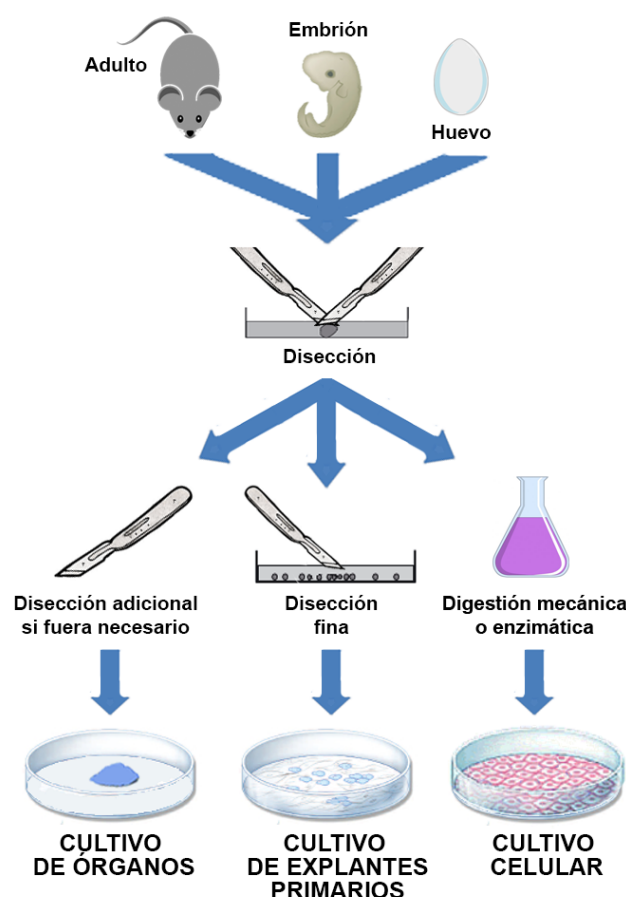


Figura III.1. Principales tipos de cultivos celulares. El cultivo de órganos consiste en el mantenimiento *in vitro* de un órgano, sin capacidad de propagación, con el fin de retener lo más posible la arquitectura característica que presentaba *in vivo*. En el cultivo de explantes primario, se cultivan fragmentos de tejidos, siendo las células presentes en la periferia capaces de propagarse. Los cultivos celulares propiamente dichos implican la dispersión de las células de un tejido en una suspensión de células aisladas que se cultivan de manera adherente o en suspensión. En general, tienen una gran capacidad de proliferación.

En la presente Tesis Doctoral se han realizado cultivos de explantes primarios y cultivos celulares que han permitido caracterizar algunos aspectos funcionales del sistema ghrelinérgico en el carpín. Las técnicas que se describen a continuación han sido realizadas en los laboratorios de la Doctora Catalina Hernández Sánchez en el Instituto de Investigaciones Biológicas del CSIC (Madrid, España), del Doctor José Miguel Cerdá-Reverter en el Instituto de Acuicultura Torre de la Sal del CSIC (Castellón, España) y del Doctor Suraj Unniappan en la Universidad de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá).

III.1. Cultivo de explantes primarios

Aunque en menor medida que un cultivo de órganos, el cultivo de explantes primarios permite conservar las interacciones histológicas y, gracias a ello, la posibilidad de mantener

los tipos celulares diferenciados, representando así una réplica bastante buena del tejido en sus condiciones naturales. En la presente Tesis Doctoral se han realizado cultivos de explantes de intestino e hígado del carpín (**Figura III.2**) orientados fundamentalmente al estudio de posibles acciones de la ghrelina sobre aspectos metabólicos, así como a la caracterización de sus mecanismos de acción. Como medio de cultivo se empleó el medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un aporte de NaHCO_3 para adecuarlo a la osmolaridad de los peces y con los antibióticos penicilina, estreptomicina y gentamicina para reducir los riesgos de contaminación. Estos cultivos se han realizado siguiendo la metodología puesta a punto previamente por nuestro grupo de investigación para tejidos del carpín (Sánchez-Breña *et al.*, 2016).

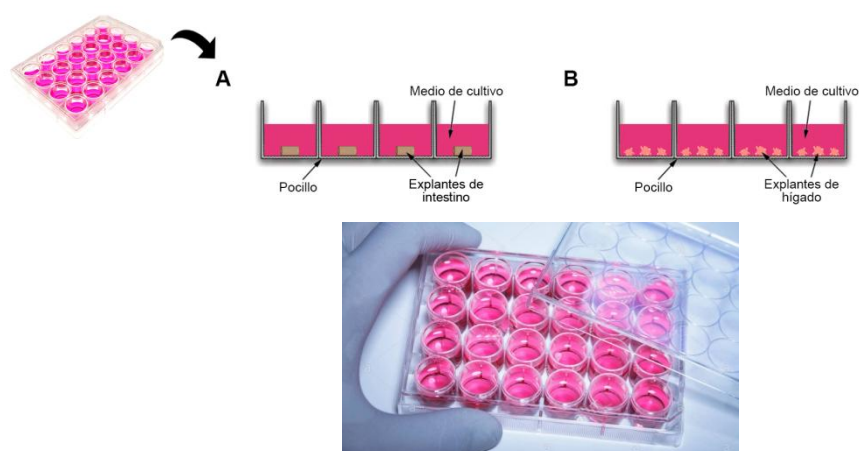


Figura III.2. Representación esquemática e imagen de placas de cultivo conteniendo explantes de intestino (A) e hígado (B) de carpín mantenidos en medio DMEM.

Procedimiento:

(Realizar en condiciones de la mayor esterilidad posible en campana de flujo laminar)

1) Preparar el medio de cultivo:

DMEM (Thermo Scientific)	500 ml
NaHCO_3	1,85 g
Penicilina (10.000U/ml)/Estreptomicina (10 mg/ml)	5 ml
Gentamicinina (5 mg/ml)	250 mg

A partir de aquí denominaremos DMEM¹ a este medio para identificarlo respecto al resto de medios DMEM descritos en el presente Anexo metodológico.

2) Distribuir 1 ml de DMEM¹ en placas de cultivo de 24 pocillos.

3) Diseccionar los tejidos de interés, en este caso el intestino e hígado del carpín. El intestino, bien limpio de restos de otros tejidos, se secciona en fragmentos de aproximadamente 1-2 mm de grosor. Debido a la concentración bacteriana en intestino, y con el fin de reducir posibles contaminaciones, sumergir los fragmentos intestinales en un recipiente conteniendo DMEM¹ con un aporte extra de

antibióticos (10 veces mayor que en el medio original) durante 1 min. Tras esta inmersión, distribuir los fragmentos en los diferentes pocillos de las placas de cultivo previamente preparadas. En el caso del hígado, triturar el tejido lo más posible con ayuda de un escalpelo y distribuir porciones de 15-20 mg del triturado resultante en los pocillos de las placas de cultivo utilizando una pipeta (15-20 μ l de pipeteado corresponden aproximadamente a 15-20 mg de tejido).

- 4) Incubar las placas a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ en un incubador de tejidos gaseando con carbógeno (5% CO_2 y 95% O_2) durante 2 horas para su estabilización.
- 5) Tras el tiempo de estabilización, retirar el medio de cultivo de los pocillos y reemplazarlo por medio nuevo. Este medio consistirá únicamente en medio DMEM¹ en el caso de los grupos control, o en medio DMEM¹ conteniendo las hormonas/fármacos en las concentraciones que se deseen ensayar en cada uno de los experimentos. En todos los estudios incluidos en la presente Tesis, se ha empleado la forma acilada de ghrelina de 19 aminoácidos del carpín (GTS(Octanoyl)FLSPAQ KPQGRRPPRM; GenScript). En algunos experimentos se han empleado, además, un antagonista del receptor GHS-R1a (péptido liberador de hormona de crecimiento 6 [D-Lys³], [D-Lys³]-GHRP-6) e inhibidores de las vías de señalización intracelular de la PLC-PKC (U73122) y de la AC-PKA (H89). Estos antagonistas/inhibidores se añadieron al cultivo 15 min antes de la adición de ghrelina.
- 6) Incubar las placas en el incubador durante el tiempo de ensayo establecido en cada experimento.
- 7) Recoger las muestras de tejido, y del medio de cultivo si procede, en tubos eppendorf. En el caso del intestino, las porciones de tejidos son fácilmente recolectables con pinzas. Sin embargo, en el caso del hígado, debido a su dispersión, es aconsejable recoger todo el contenido del pocillo en el tubo, centrifugar durante 2-3 min a 12.000 g y retirar posteriormente el medio de cultivo (**Figura III.3**).
- 8) Congelar las muestras en nitrógeno líquido y conservarlas a -80°C hasta su posterior análisis de expresión génica y/o proteica.

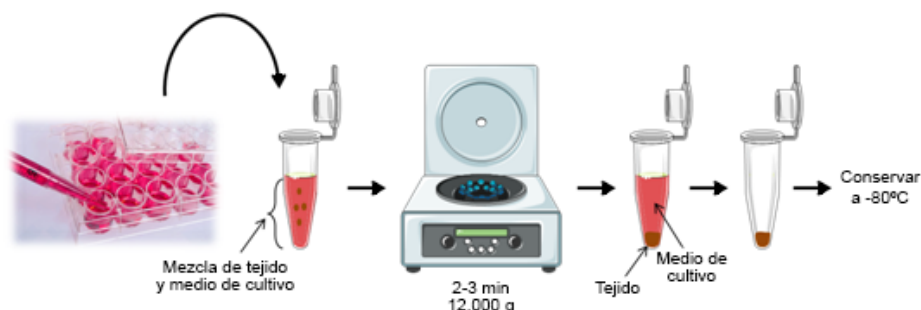


Figura III.3. Recogida de muestras de explantes primarios de hígado de carpín en cultivo. Los fragmentos de hígado se recogen junto con el medio de cultivo, se centrifugan durante 2-3 min y se descarta el medio de cultivo. El tejido recuperado se conserva a -80°C hasta su posterior utilización.

III.2. Cultivo celular

El cultivo celular o cultivo de células aisladas se puede clasificar en varios subtipos (Yadav y Tyagi, 2005; Freshney, 2010). El cultivo de las células iniciales obtenidas de un explante primario en cultivo o de la disgregación de un tejido original recién extraído recibe el nombre de cultivo celular primario. Estas células pueden ser incapaces de reproducirse en cultivo o presentar un grado de división bajo, en cuyo caso mantienen la viabilidad durante un periodo de tiempo limitado, corto, y luego mueren. Pero en la mayoría de los casos presentan una importante capacidad de multiplicación durante un elevado número de generaciones; en estos casos, se otorga a las células el nombre de línea celular. Si el cultivo de estas células es capaz de mantenerse un periodo de tiempo limitado, se habla de una línea celular primaria o finita. Sin embargo, cuando las células presentan una capacidad ilimitada de multiplicación, lo cual generalmente implica un cambio genotípico o transformación, pasan a ser consideradas una línea celular continua o estable. Las líneas celulares se propagan rápidamente y van ocupando de manera gradual una mayor área o volumen del cultivo disponible. Esta característica ofrece la posibilidad de subcultivo o “pase”, término que hace referencia a la transferencia de células desde un cultivo crecido a un nuevo recipiente para que se genere otro cultivo, dando lugar a cultivos secundarios, terciarios, etc. La **Figura III.4** muestra de una manera gráfica los distintos tipos de cultivos celulares.

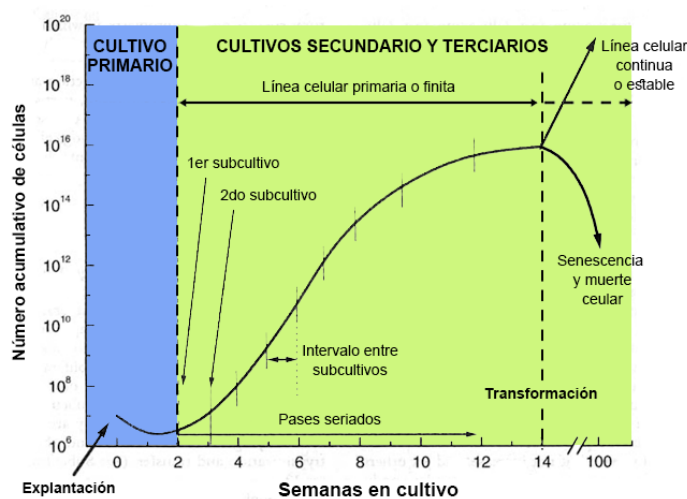


Figura III.4. Evolución de una línea celular hipotética en los diferentes tipos de cultivos celulares.

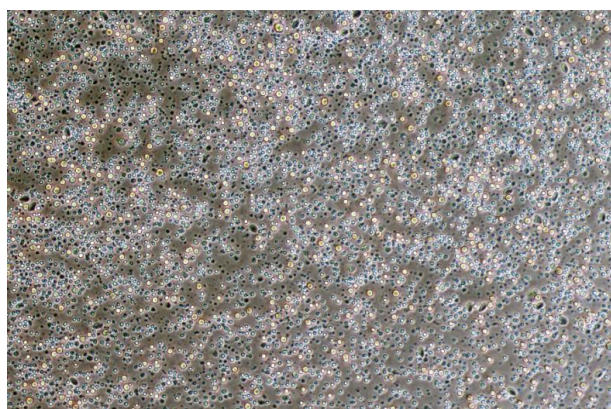
En la presente Tesis Doctoral, se han empleado dos tipos de cultivos celulares (primario y de línea celular continua) que se detallan a continuación. En estos cultivos adquieren especial importancia las condiciones de esterilidad, pues son altamente vulnerables a la entrada de microorganismos contaminantes, por lo que toda manipulación de cultivos celulares se ha de realizar en campana de flujo laminar.

III.2.1. Cultivo celular primario

El cultivo celular primario se ha utilizado para el estudio de la posible acción de la ghrelina sobre mecanismos de translocación de transportadores de glucosa en células intestinales de carpín. Para ello, se procedió al aislamiento y cultivo de células del intestino a fin de realizar un análisis inmunocitoquímico de dichos transportadores.

III.2.1.1. Aislamiento de células intestinales del carpín

El método de aislamiento de células intestinales empleado es una adaptación de la técnica descrita por El-Sabry y colaboradores (2013) para trucha arco iris. Se basa en una disgregación del tejido intestinal tanto por métodos mecánicos como enzimáticos, empleando para el último una solución de colagenasa que rompe los enlaces peptídicos de las moléculas de colágeno de las células favoreciendo así la ruptura de las uniones entre ellas. Las células intestinales resultantes presentan una morfología epitelial y, las viables, son redondeadas, intactas y caracterizadas por una membrana celular lisa, no plegada (**Fotografía III.1**). Estas células se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo donde son capaces de proliferar, presentando un crecimiento en monocapa. En los cultivos realizados para la presente Tesis Doctoral las células intestinales de carpín han alcanzado la confluencia en 2-3 días.



Fotografía III.1. Células intestinales primarias de carpín.

Procedimiento:

- 1) Rociar a los carpines con etanol 70% para reducir los riesgos de contaminación.
- 2) Extraer el intestino, limpiarlo de todo resto de otros tejidos y sumergirlo en tres sucesivos recipientes con un volumen grande de agua desionizada autoclavada.
- 3) Incubar el tejido en DMEM conteniendo NaHCO_3 44 mM, 2% de penicilina-estreptomicina y 0,1% de gentamicina durante 1 hora a 4°C. Repetir una segunda incubación en medio nuevo.
- 4) Abrir los fragmentos de intestino longitudinalmente y cortarlos en trozos de 1 cm^2 .

- 5) Incubar los trozos de intestino en 50 ml de DMEM¹ con collagenasa (1 mg/ml) a 4°C hasta el día siguiente.
- 6) Agitar el recipiente conteniendo los fragmentos intestinales durante 30 min a temperatura ambiente.
- 7) Despegar los enterocitos de la mucosa intestinal con ayuda de una pipeta Pasteur.
- 8) Filtrar la suspensión celular resultante a través de un filtro de 30 µM y coleccionar en tubos falcon.
- 9) Centrifugar a 3.000g durante 5 min.
- 10) Realizar tres lavados del pellet conteniendo las células intestinales con DMEM¹. En cada lavado, descartar el sobrenadante, añadir 5 ml de DMEM¹, agitar por inversión y centrifugar a 3.000g durante 5 min.
- 11) Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de DMEM.
- 12) Cuantificar las células y preparar una solución de concentración 1×10^6 células/ml en DMEM¹ suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) (DMEM²).
- 13) Distribuir esta solución celular en placas de 24 pocillos (1 ml/pocillo). Es conveniente que las placas sean previamente tratadas con gelatina, colágeno o polilisina para facilitar la adhesión celular.
- 14) Cultivar las células a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ en incubador con carbógeno.
- 15) Cambiar el medio de cultivo (DMEM²) diariamente para eliminar las células no adherentes hasta que el cultivo alcance la confluencia.

III.2.1.2. Estudio inmunocitoquímico de procesos de translocación

Los procesos de translocación de transportadores de glucosa en células intestinales aisladas del carpín se han estudiado empleando la metodología descrita por Díaz y colaboradores (2007). Este método se basa en la cuantificación de la cantidad de un transportador presente en la superficie celular en relación a la cantidad de transportador existente en la totalidad de la célula, lo que permite el análisis del grado de translocación que ha tenido lugar, por ejemplo, durante un periodo de tiempo determinado o como resultado del tratamiento con cierto agente, en este caso de la ghrelina. En este sentido, en los trabajos incluidos en la presente Memoria, células intestinales primarias confluentes se han tratado (o no, grupo control) con ghrelina, tras lo cual se procedió a la determinación de la fracción de los transportadores GLUT2, SGLT1 y SGLT2 presente en la superficie celular. La determinación de la cantidad de cada transportador se efectuó empleando una tinción inmunocitoquímica del mismo mediante el uso de un anticuerpo específico (véase el apartado IV.3 del Anexo metodológico IV para detalles de los anticuerpos empleados), tanto en

células intactas (determinación de los niveles en la superficie) como en células permeabilizadas con detergentes (determinación de los niveles totales).

Procedimiento: (a realizar en células con un alto grado confluencia)

- 1) Incubar las células en medio carente de suero (DMEM¹) a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ en incubador con carbógeno durante 3-5 horas.
- 2) Tras el tiempo de incubación, retirar el medio de cultivo de los pocillos y reemplazarlo por DMEM¹ nuevo conteniendo (o no, grupo control) la hormona/fármaco a ensayar en la concentración deseada. En este caso se usó 1 ml de DMEM¹ conteniendo una concentración de 10 nM de la forma acilada de ghrelina de 19 aminoácidos del carpín.
- 3) Volver a incubar las placas en el incubador durante el tiempo que se desee ensayar (30, 60 ó 120 min en nuestro caso)
- 4) Retirar el medio de cultivo y realizar tres lavados de las células con PBS frío suplementado con CaCl_2 1 mM y MgCl_2 1 mM (PBS+).
- 5) Separar las placas de células en dos lotes, uno de ellos para proceder al marcaje de los transportadores de glucosa en la superficie celular, y el otro para el marcaje de la totalidad de transportadores de glucosa presentes en la célula.

Marcaje de transportadores en la superficie celular

- Bloquear las células en PBS+ conteniendo 5% BSA durante 15 min a 4°C .
- Incubar en solución de anticuerpo primario (anti-GLUT2, anti-SGLT1 y anti-SGLT2) disuelto en PBS+ + 5% BSA (relación 1:500, en la presente Tesis) durante 1 hora a 4°C .
- Realizar tres lavados de las células con PBS+ frío.
- Fijar las células en paraformaldehído (4%) disuelto en PBS+ durante 30 min a 4°C .
- Neutralizar el fijador mediante incubación con glicina 100 mM disuelta en PBS+ durante 10 min a 4°C .

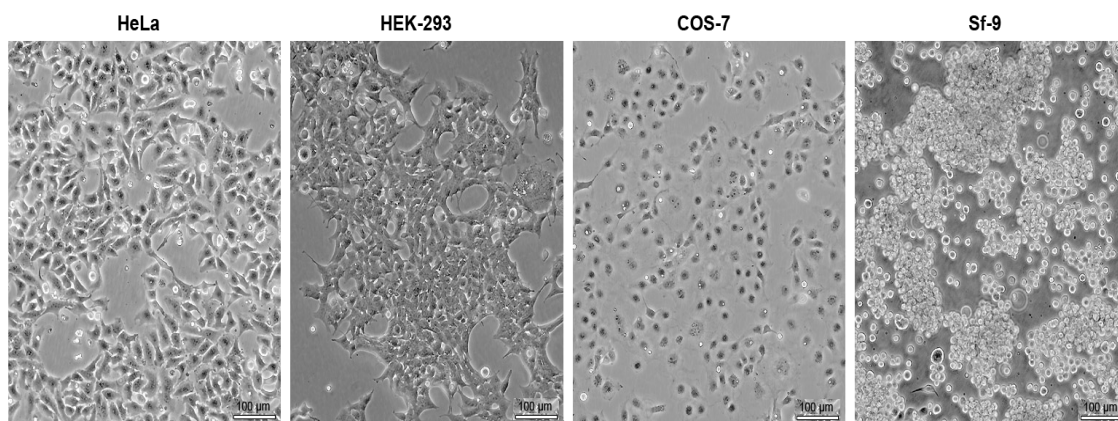
Marcaje de transportadores totales en la célula

- Fijar las células en paraformaldehído (4%) disuelto en PBS+ durante 30 min a 4°C .
- Neutralizar el fijador mediante incubación con glicina 100 mM disuelta en PBS+ durante 10 min a 4°C .
- Permeabilizar las células con 0,1% Tritón X-100 disuelto en PBS+ durante 30 min a 4°C .
- Bloquear las células en PBS+ conteniendo 5% BSA durante 15 min a 4°C .
- Incubar en solución de anticuerpo primario (anti-GLUT2, anti-SGLT1 y anti-SGLT2) disuelto en PBS+ + 5% BSA (relación 1:500) durante 1 hora a 4°C .

- Realizar tres lavados de las células con PBS+ frío.
- 6) Incubar los dos lotes de células en solución de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP; relación 1:3000) durante 1 hora a 4°C. Esta enzima es capaz de oxidar diversos sustratos, entre ellos el diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD).
 - 7) Añadir a cada pocillo 300 µl de solución conteniendo 0,4 mg/ml de OPD + 0,4 mg/ml de peróxido de hidrógeno con urea + 0,05 M de tampón fosfato-citrato (pH 5.0) disueltos en agua. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, protegiendo las placas de la luz.
 - 8) Leer la absorbancia a 450 nm.
- Nota:* La reacción del OPD puede pararse con HCl 3 N o con H₂SO₄ 3 M, debiéndose en este caso leer la absorbancia a 492 nm.
- 9) Tras la lectura de la absorbancia, calcular la cantidad de cada transportador presente en las membranas celulares como fracción de la cantidad total de transportador en las células completas.

III.2.2. Cultivo de línea celular continua o estable

El cultivo de línea celular continua o estable se ha empleado como una herramienta para el estudio *in vitro* de la capacidad de expresión y traducción de material genético de carpín, concretamente las dos variantes de *splicing* encontradas de GOAT. Para ello, líneas celulares se transfectaron con el ADN en cuestión y se procedió a un análisis de la expresión génica y proteica mediante PCR y *Western blot*, respectivamente. Se trabajó con las líneas celulares HeLa (procedente de una muestra de cáncer cérvico-uterino humano), HEK-293 (aislada a partir de células embrionarias de riñón humano), COS-7 (fibroblastos derivados del riñón de mono verde africano) y Sf-9 (derivada del tejido ovárico del gusano cogollero del maíz), todas ellas de tipo adherente y crecimiento en monocapa (**Fotografía III.2**).



Fotografía III.2. Líneas celulares empleadas en los trabajos incluidos en la presente Tesis Doctoral: líneas de mamíferos HeLa, HEK-293 y COS-7, y línea de insectos Sf-9.

III.2.2.1. *Mantenimiento y manipulación de líneas celulares estables*

Las condiciones de cultivo y mantenimiento de células estables varían en función de la línea celular. Las líneas HeLa, HEK-293 y COS-7 fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM suplementado con un aporte extra de glutamina, 10% de FBS y 1% de penicilina (10.000U/ml)-estreptomicina (10mg/ml) (medio al cual nos referiremos como DMEM³), y mantenidas a 37°C en un incubador con carbógeno. Las células Sf-9 se cultivaron en medio carente de proteínas y rico en glutamina (Insect-XPRESS™, Lonza) suplementado con 1% de penicilina-estreptomicina y, dado que proceden de animales ectotermos, no requieren condiciones de mantenimiento muy exigentes, pudiendo mantenerse a temperatura ambiente (21-26°C) sin aporte de CO₂.

Bajo las condiciones de cultivo adecuadas, las células estables se encuentran en continua división, creciendo y ocupando de manera gradual un mayor área o volumen del cultivo disponible. Grados de confluencia elevados conllevan efectos negativos para el cultivo, tales como agotamiento de los nutrientes del medio, acumulación de células apoptóticas o necróticas e inhibición de la división celular por contacto (Yadav y Tyagi, 2005). Por ello, el trabajo con cultivos celulares requiere un mantenimiento rutinario consistente fundamentalmente en cambios de medio y pases de células. En los cultivos adherentes empleados en la presente Tesis, los cambios de medio se realizan directamente por eliminación del medio antiguo por aspiración y reemplazo por medio fresco. Los pases de células, por su parte, requieren que las células sean inicialmente despegadas de la superficie de adhesión, tras lo cual un pequeño número de ellas se mantiene en el continente de cultivo (el mismo o uno nuevo) y se añade medio fresco.

Procedimiento:

Cambio de medio

- 1) Retirar medio de cultivo antiguo por aspiración.
- 2) Reemplazar por medio de cultivo fresco atemperado a 37°C (excepto para Sf-9).

Pase de células

HeLa

- 1) Retirar medio de cultivo antiguo por aspiración.
- 2) Lavar las células con 10 ml de PBS 1x. Retirar por aspiración.
- 3) Despegar las células de la superficie de adhesión mediante la adición de 2 ml tripsina (agente degradante de la matriz extracelular). Incubar durante 3 min a 37°C.

- 4) Neutralizar la tripsina añadiendo 10 ml de medio de cultivo fresco atemperado a 37°C.
- 5) Mantener 1-2 ml de la suspensión celular y eliminar el resto por aspiración.
- 6) Añadir 10 ml de medio de cultivo fresco atemperado a 37°C.

HEK-293, COS-7 y Sf-9

- 1) Despegar las células de la superficie de adhesión mediante el pipeteo repetido del medio de cultivo antiguo.
- 2) Mantener 1-2 ml de la suspensión celular y eliminar el resto por aspiración.
- 3) Añadir 10 ml de medio de cultivo fresco atemperado a 37°C (excepto para Sf-9).

III.2.2.2. Transfección celular

La transfección consiste en la introducción en células eucariotas de material genético externo que se encuentra inserto en plásmidos, vectores víricos u otras herramientas para la transferencia. En los trabajos incluidos en la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la transfección de las líneas celulares arriba mencionadas con ADN de ghrelina y GOAT de carpín previamente clonado en vectores de expresión (como se detalló en el Anexo metodológico II). Entre los diversos métodos disponibles, las transfecciones se han llevado a cabo mediante lipofección (**Figura III.5**) (Koynova *et al.*, 2005; Tros de Ilarduya *et al.*, 2010), técnica basada en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y el ADN de interés con gran afinidad por las membranas celulares.

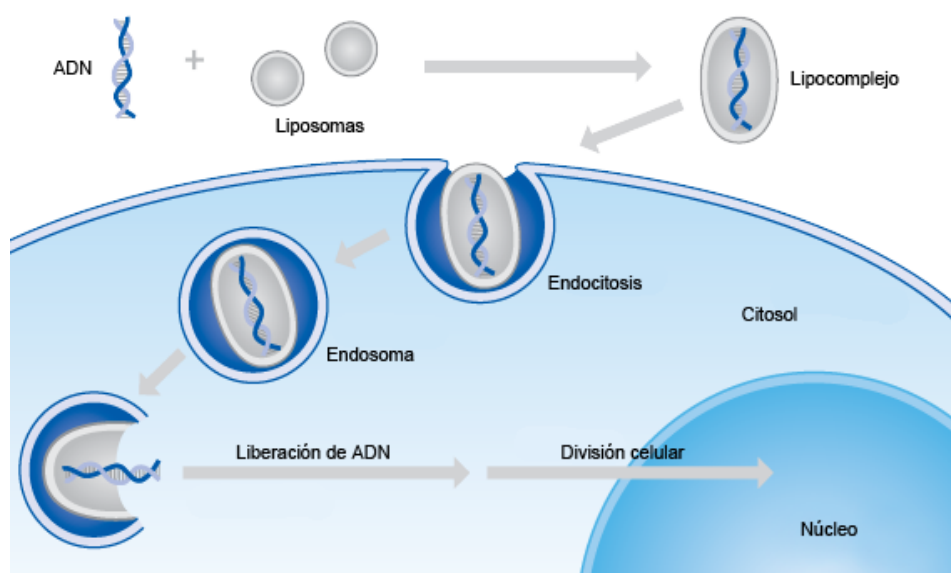


Figura III.5. Esquema del proceso de lipofección. Los lipocomplejos que llevan el material genético de interés penetran en la célula por endocitosis, tras lo cual se rompen liberando el ADN en el citosol. La división de la célula permitirá a continuación que el ADN penetre en el núcleo, donde será capaz de expresarse y producir una proteína.

Procedimiento:

1) Recuento y plaqueo de células

Las transfecciones se realizan en placas estériles que se siembran inicialmente con un número de células óptimo que depende del tipo celular. En el caso de las transfecciones de esta Tesis, se plaquearon 70.000 células/cm² para las HeLa y 40.000 células/cm² para el resto de tipos celulares.

- Despegar las células de la superficie de adhesión (véase el apartado III.2.2.1) y pasar la suspensión celular a un tubo falcon.
- Proceder al recuento del número de células presentes en la suspensión celular colocando 10 µl de la misma en una cámara de Neubauer y contando las células en cada cuadrante bajo el microscopio. Hacer una estimación del número total de células empleando la siguiente relación:

$$N^{\circ} \text{ medio de células por cuadrante} \times 10.000 = N^{\circ} \text{ células/ml}$$

- Si es necesario, diluir la suspensión celular con medio de cultivo fresco hasta obtener la cantidad de células necesarias.
- Añadir a cada pocillo de la placa el volumen correspondiente de suspensión celular según su tamaño.

2) Transfección

Se procedió a las transfecciones cuando las células presentaban un grado de confluencia del 80-95%, lo cual generalmente ocurría al día siguiente del plaqueo. Éstas se realizaron utilizando el reactivo comercial lipofectamina (Invitrogen) y usando las cantidades del mismo y de ADN que aparecen indicadas en la tabla siguiente:

Tipo de placa	Superficie por pocillo (cm ²)	Volumen de medio de cultivo	Cantidad de ADN (µg) y volumen de dilución	Cantidad de lipofectamina (µl) y volumen de dilución
96 poc	0,3	100 µl	0,2 µg en 25 µl de Optimem	0,5 µl en 25 µl de Optimem
24 poc	2	500 µl	0,8 µg en 50 µl de Optimem	2 µl en 50 µl de Optimem
12 poc	4	1 ml	1,6 µg en 100 µl de Optimem	4 µl en 100 µl de Optimem
6 poc	10	2 ml	4 µg en 250 µl de Optimem	10 µl en 250 µl de Optimem
35 mm	10	2 ml	4 µg en 250 µl de Optimem	10 µl en 250 µl de Optimem

- Mezclar el volumen necesario de ADN en el volumen correspondiente de medio Optimem. Reservar en hielo.
- Mezclar el volumen necesario de lipofectamina en el volumen correspondiente de Optimem. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente.

- Combinar la dilución de ADN con la dilución de lipofectamina en una relación 1:1. Mezclar e incubar durante 20 min a temperatura ambiente.
- Retirar de la placa el medio de cultivo de cada pocillo por aspiración.
- Lavar con PBS 1x (opcional). Retirar por aspiración.
- Añadir a cada pocillo medio de cultivo sin suero ni antibióticos atemperado a 37°C (excepto para Sf-9).
- Añadir, gota a gota, la mezcla de ADN + lipofectamina.
- Incubar cada línea celular como corresponde en incubador a 37°C para las líneas de mamíferos y a temperatura ambiente para la línea de insectos.
- Al cabo de 4-5 horas, retirar el medio de cultivo de cada pocillo y reemplazar por medio de cultivo complementado con suero (excepto para Sf-9) y antibióticos atemperado a 37°C (excepto para Sf-9).
- Dejar incubar durante el tiempo de transfección (48 h en los trabajos presentados en esta Memoria).

Numerosos procedimientos experimentales pueden seguir a una transfección. En el caso de los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral, las transfecciones fueron seguidas de la extracción de ARNm y el posterior análisis de la expresión génica mediante PCR (véase los apartados II.1.1, II.2 y II.3 del Anexo metodológico II) o de la lisis de las células para la liberación de proteínas, su posterior purificación y cuantificación, y su análisis mediante *Western blot* (véase los apartados II.8.1, II.9.1 y II.10 del Anexo metodológico II).

Bibliografía

- Díaz M, Antonescu CN, Capilla E, Klip A, Planas JV (2007) Fish glucose transporter (GLUT)-4 differs from rat GLUT4 in its traffic characteristics but can translocate to the cell surface in response to insulin in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 148: 5248-5257.
- El-Sabry A, Soliman FM, Handy RD, Al-Tonsy MOA, Soliman HAM (2013) Developing and characterizing of primary intestinal cells culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in studying of copper sulphate and copper nanoparticles accumulation. *Egy J Aquac* 3: 19-38.
- Freshney RI (2010) *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, Sixth Edition*. John Wiley & Sons, Nueva Jersey, Estados Unidos. 796 pp.
- Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, Jackson CM (1907) Observations of the living developing nerve fiber. *Anat Rec* 5: 116-128.

- Koynova R, Wang L, Tarahovsky Y, MacDonald RC (2005) Lipid phase control of DNA delivery. *Bioconjug Chem* 16: 1335-1339.
- Tros de Ilarduya C, Sun Y, Düzgünes N (2010) Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci* 40: 159-170.
- Yadav PR, Tyagi R (2005) *Cell culture*. Discovery Publishing House, Nueva Delhi, India. 324 pp.

INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunohistoquímica es una técnica que combina la inmunología con la histología en la determinación de una o más variedades de antígeno, generalmente proteínas, presentes en células o tejidos, permitiendo visualizar tanto su presencia como su localización microanatómica. Los métodos inmunohistoquímicos se desarrollaron a partir de 1941 con los trabajos de Albert H. Coons (Coons, 1971), y con los años se han ido configurando en métodos prácticos, útiles, de fácil realización y de extensa aplicabilidad. Al tratarse de una técnica de inmunotinción, la inmunohistoquímica se fundamenta en la capacidad de reconocimiento de los anticuerpos por un antígeno determinado. La reacción de unión antígeno-anticuerpo es visualizada mediante marcajes añadidos a los anticuerpos, que pueden consistir en una sustancia que produce coloración o una sustancia que absorbe o emite luz. Si la marca unida al anticuerpo es una molécula fluorescente o fluoróforo, la técnica recibe el nombre específico de inmunohistoquímica con detección por fluorescencia o inmunofluorescencia (Wick *et al.*, 1982). Ésta puede ser directa o primaria, si emplea un único anticuerpo que a su vez reconoce al antígeno y se encuentra unido al fluoróforo, o indirecta o secundaria, si el marcaje se encuentra unido a un segundo anticuerpo (Figura IV.1) (Robinson *et al.*, 2009).

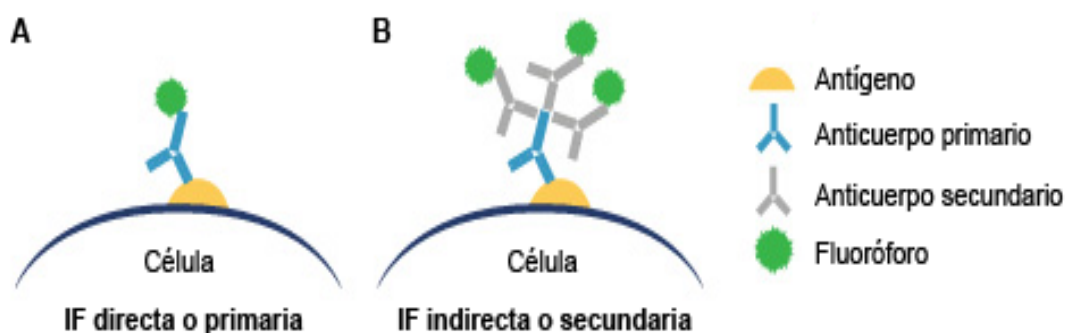


Figura IV.1. Principales tipos de inmunofluorescencia (IF). A) Inmunofluorescencia directa o primaria. Emplea un único anticuerpo (primario) que se encuentra químicamente unido a un fluoróforo y reconoce y se une a la molécula diana o antígeno. B) Inmunofluorescencia indirecta o secundaria. Hace uso de dos anticuerpos, uno primario que reconoce al antígeno y uno secundario marcado con el fluoróforo que reconoce y se une al anticuerpo primario.

En la presente Tesis Doctoral, la técnica de inmunofluorescencia se ha empleado para el estudio de la distribución anatómica de la enzima GOAT en las distintas regiones encefálicas del carpín (tinciones simples), así como en secciones de tracto gastrointestinal e hígado para

marcar células que expresen tanto ghrelina/GOAT/GHS-R1a como enzimas digestivas, transportadores de glucosa y hormonas gastrointestinales (tinciones dobles). Además, se han realizado tinciones inmunohistoquímicas de secciones intestinales de pez cebra para estudiar la presencia de ghrelina. En todos los casos se ha aplicado inmunofluorescencia de tipo indirecta. La técnica que se describe a continuación ha sido realizada en el laboratorio principal de realización de la Tesis y en el laboratorio del Doctor Suraj Unniappan en la Universidad de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá).

IV.1. Inclusión de muestras en parafina

La técnica de inmunofluorescencia, como todas las técnicas de imagen, requiere que los tejidos de estudio mantengan su estructura anatómica original tras su extracción, lo que se consigue mediante su fijación en sustancias con propiedades fijadoras, como el paraformaldehído. Los procesos de extracción y fijación de tejidos utilizados se detallan en el Anexo metodológico I. Una vez fijadas, las muestras se preparan en soportes estables a fin de proceder a su sección en láminas finas en las que se realizarán los análisis de imagen. En el marco de la presente Tesis Doctoral, los tejidos se han incluido en parafina (Sainte-Marie, 1962; Buchwalow y Böcker, 2010a), sustancia de aspecto ceroso formada por mezclas de hidrocarburos saturados que se funde al calor (40-70°C, según la composición de la mezcla de hidrocarburos) pero permanece en estado sólido a temperatura ambiente o en frío, lo que permite su manipulación para fabricar bloques que contengan las muestras de interés. Además, la parafina penetra en las muestras, ejerciendo una acción protectora sobre su estructura anatómica.

El protocolo de inclusión en parafina empleado en los trabajos de la presente Tesis Doctoral se muestra en la **Figura IV.2**. El proceso se inicia con un paso previo de lavado del tejido para la eliminación de la sustancia fijadora mediante su inmersión en una solución de PBS 1x, seguido de una solución de NaCl 0,85%. La parafina no es miscible con agua, pero éste es el componente principal de todos los tejidos, y, la mayoría de los fijadores son soluciones acuosas, de modo que para la parafina líquida penetre completamente en el tejido ha de sustituirse el agua presente en el mismo por un solvente orgánico. Esto se consigue mediante la deshidratación del tejido en alcoholes, normalmente etanol, de gradación creciente hasta alcohol de 100°. Posteriormente se transfiere el tejido a un líquido denominado sustancia intermediaria, que es miscible tanto con el alcohol de 100° como con la parafina, como por ejemplo benceno, xileno, tolueno u óxido de propileno, entre otros. Estas sustancias son normalmente aclarantes, por lo que la translucidez de la pieza será indicativa de la penetración de la sustancia intermediaria en el tejido. El tiempo de

incubación de la pieza en algunos de estos líquidos intermediarios como el tolueno o xileno no debe ser excesivo puesto que estas sustancias endurecen la pieza, creando problemas al hacer las secciones.

Por último, se pasa el tejido a parafina previamente fundida; normalmente se realiza un mínimo de tres pasos por parafina líquida para favorecer una completa sustitución del líquido intermediario por la parafina. El tiempo de inmersión en cada parafina depende de lo volátil que sea el líquido intermediario y del tamaño de la pieza a fijar, de manera que será mayor cuanto menos volátil es el líquido intermediario o más grande sea la muestra de tejido. Tras el embebimiento completo de la muestra, se vierte parafina líquida en un molde, se introduce la muestra y se coloca según la orientación deseada de corte, dejando solidificar a temperatura ambiente.

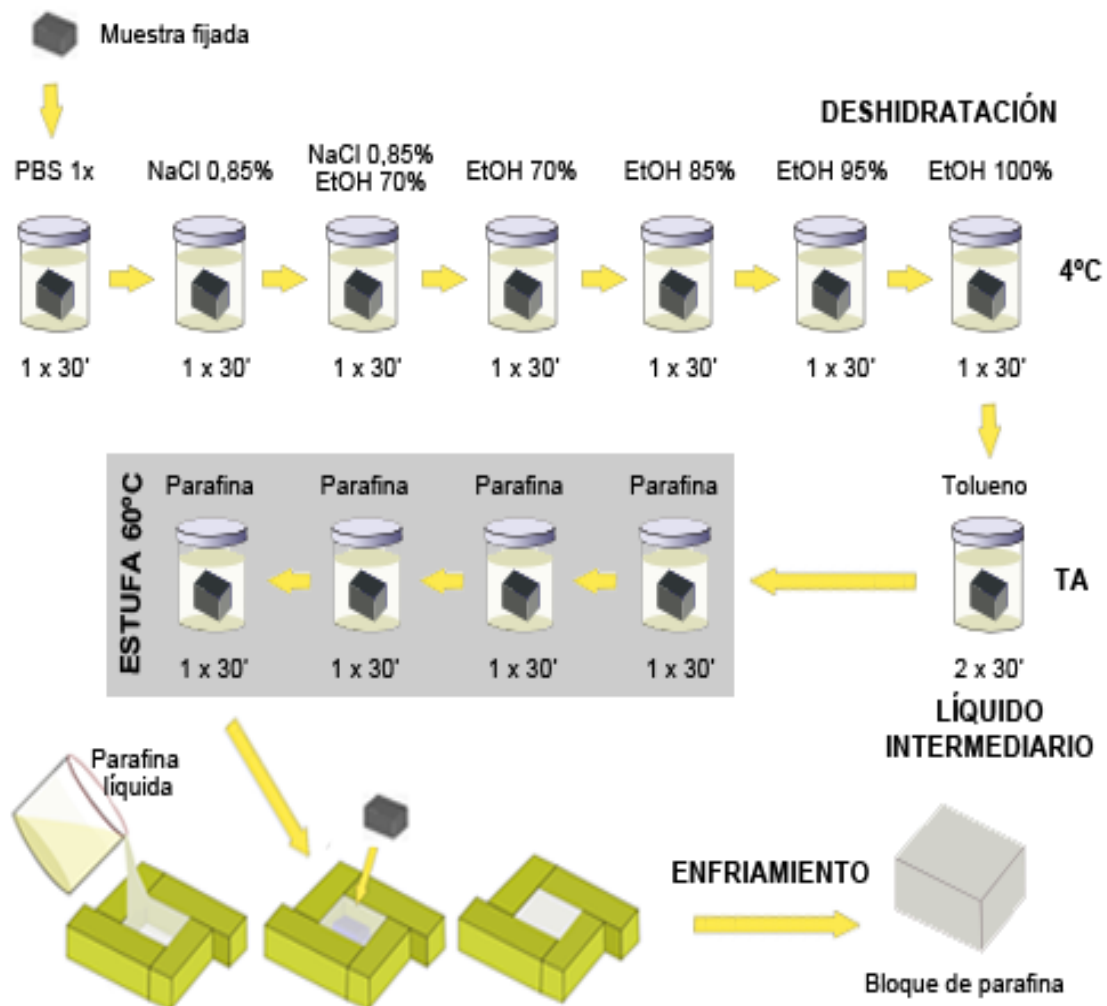


Figura IV.2. Esquema del procedimiento de inclusión de una muestra de tejido en parafina. Los pasos son comunes a cualquier inclusión en parafina, aunque los tiempos de incubación en cada sustancia pueden variar en función del tamaño de la muestra, el tipo de tejido o, por ejemplo, el tipo de líquido intermediario utilizado. En el esquema se indican los tiempos empleados para los trabajos de inmunofluorescencia de la presente Tesis Doctoral.

Procedimiento:

- 1) A partir de una muestra fijada como se detalla en el Anexo metodológico I, realizar los siguientes baños sucesivos:

▪ PBS 1x	30 min a 4°C
▪ NaCl 0,85%	30 min a 4°C
▪ NaCl 0,85%/EtOH 70%	30 min a 4°C
▪ EtOH 70%	30 min a 4°C
▪ EtOH 85%	30 min a 4°C
▪ EtOH 95%	30 min a 4°C
▪ EtOH 100%	30 min a 4°C
▪ Tolueno	2 x 30 min a temperatura ambiente (en agitación)
▪ Parafina	4 x 30 min a 60-65°C
- 2) Rellenar un molde para parafina con parafina líquida.
- 3) Colocar el tejido en el centro del molde y orientarlo de manera adecuada para su corte.
- 4) Cubrir el tejido con parafina hasta rellenar completamente el molde.
- 5) Dejar solidificar a temperatura ambiente.

IV.2. Corte de las muestras en micrótopo

Una vez que el tejido de interés se ha incluido en un soporte, en este caso parafina, el siguiente paso es su corte en secciones finas empleando un micrótopo (Rolls, 2010a). En los trabajos de la presente Tesis Doctoral se ha empleado un micrótopo de rotación, que produce el corte transformando un movimiento de rotación del portamuestras en un movimiento de ascenso y descenso sobre una cuchilla. Los cortes sucesivos se consiguen gracias a que, en el movimiento de bajada, se produce un acercamiento del portamuestras hacia la cuchilla a una distancia que vendrá dada por el grosor de corte seleccionado; en los trabajos de la presente Tesis Doctoral todos los cortes realizados han sido de 7 µm de grosor.

En la **Figura IV.3** se muestra un esquema del procedimiento de corte con micrótopo de una muestra incluida en parafina. En primer lugar se requiere el retallado del bloque de parafina en el que se encuentra la muestra hasta obtener una forma de pirámide truncada cuya base más ancha será la que quede sujeta al portamuestras. Además, es necesario un proceso de desbastado del bloque consistente en la eliminación del espesor de parafina que existe entre la superficie del bloque y la muestra. Una vez realizados estos procesos previos sobre el bloque de parafina, se comienza con el corte de la muestra en forma de tiras de secciones unidas por las caras paralelas a la cuchilla. Con ayuda de un pincel, estas tiras se

irán colocando en la superficie de portaobjetos previamente recubiertos con soluciones que actúen de adhesivo entre el cristal y el tejido, como la polilisina, de manera que se asegura la adhesión del tejido al portaobjetos durante su procesamiento posterior. No obstante, antes de su fijación definitiva en la superficie de un portaobjetos, las tiras de cortes han de estirarse para que el tejido quede perfectamente extendido. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, la extensión de los cortes se facilita colocando las secciones sobre agua calentada a 35-40°C, de forma que el calor extiende los cortes sin llegar a su punto de fusión. El estiramiento se puede realizar en baños de agua con regulación térmica o sobre los propios portaobjetos cubiertos de agua y colocados sobre una plancha térmica regulable. Los portaobjetos se dejan secar durante toda la noche a temperatura ambiente o en estufa a 35-40°C y, una vez secos, están listos para la tinción.

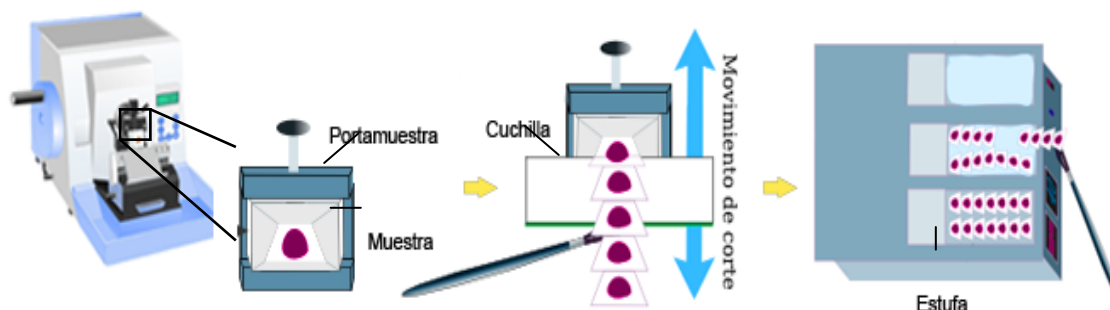


Figura IV.3. Esquema del procedimiento de corte de una muestra incluida en parafina mediante el empleo de un micrótopo de rotación, como el empleado en la presente Tesis Doctoral.

IV.3. Inmunotinción

La inmunotinción consiste en la incubación de las secciones de tejidos colocadas en los portaobjetos con los anticuerpos que permitirán la identificación de la/s proteína/s de interés (Buchwalow y Böcker, 2010b). En la presente Tesis, las proteínas de estudio fueron la ghrelina, la GOAT, el receptor GHS-R1a, las enzimas digestivas sucrasa-isomaltasa, aminopeptidasa A, tripsina y lipoproteína lipasa, los transportadores de glucosa GLUT2, SGLT1 y SGLT2, y las hormonas gastrointestinales CCK, PYY y GLP-1. Los anticuerpos utilizados para la detección de cada una de estas proteínas se muestran en la **Tabla IV.1**. El anticuerpo anti-GOAT fue empleado de manera individual en secciones obtenidas de las distintas regiones encefálicas del carpín. En secciones de tracto gastrointestinal y/o hígado se realizaron tanto tinciones simples para detectar ghrelina (en el caso del pez cebra) como dobles tinciones empleando el anticuerpo anti-ghrelina, anti-GOAT o anti-GHS-R1a y uno de los anticuerpos frente a las enzimas digestivas, transportadores de glucosa u hormonas gastrointestinales (en el caso del carpín).

Tabla IV.1. Anticuerpos primarios empleados para las tinciones inmunohistoquímicas realizadas en la presente Tesis Doctoral.

Proteína diana	Tipo de anticuerpo	Huésped	Casa comercial	Número de catálogo
Ghrelin	Monoclonal	Ratón	Abcam	ab57222
	Policlonal	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-031-31
GOAT	Policlonal	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-032-12
	Policlonal	Conejo	Abcam	ab140889
GHS-R1a	Policlonal	Conejo	Phoenix Pharmaceuticals	H-001-62
	Policlonal	Conejo	Abcam	ab95250
Sucrasa-isomaltasa	Policlonal	Conejo	Abcam	ab98872
Aminopeptidasa A	Policlonal	Conejo	Abcam	ab109775
Tripsina	Monoclonal	Conejo	Abcam	ab200997
Lipoproteína lipasa	Policlonal	Conejo	Abcam	ab137821
GLUT2	Policlonal	Cabra	Abcam	ab111117
SGLT1	Policlonal	Conejo	Abcam	ab14686
SGLT2	Policlonal	Conejo	Abcam	ab85626
CCK	Policlonal	Conejo	Abcam	ab83180
PYY	Policlonal	Conejo	Abcam	ab22663
GLP-1	Monoclonal	Ratón	Abcam	ab26278

En los casos de inmunotinción de cortes histológicos procedentes de bloques de parafina, antes de realizar la incubación con anticuerpos es necesario eliminar los restos de parafina de las secciones y proceder a la rehidratación de los tejidos, lo que se consigue mediante baños en un líquido intermediario (normalmente xileno; en este caso se empleó dicho compuesto y su sustitutivo Ottix Plus) y en alcoholes de gradación decreciente. Asimismo, toda incubación con anticuerpos (véase apartado II.10 del Anexo metodológico II) va generalmente precedida de un paso de bloqueo dirigido a reducir los lugares de unión inespecíficos de las proteínas al anticuerpo, para lo cual se emplearon soluciones ricas en proteínas, como la leche desnatada en polvo o el BSA.

Tras el bloqueo y la incubación con los anticuerpos primarios, y después de un paso de lavado, las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con un fluoróforo. Los anticuerpos secundarios empleados en la presente Tesis se muestran en la **Tabla IV.2**. Junto a los anticuerpos secundarios fluorescentes, que revelarán la presencia de las proteínas de interés, otro marcador fluorescente que acompaña a la técnica de inmunofluorescencia es el DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol), compuesto que cruza las membranas celulares y se une fuertemente a regiones enriquecidas en A y T de secuencias de ADN emitiendo fluorescencia de color azul, por lo que actúa como marcador de los núcleos celulares. Tras la adición de DAPI, los pasos finales en la inmunotinción consisten en el

recubrimiento de los cortes con un medio fijador (normalmente aplicado de manera conjunta con DAPI) y la protección de los mismos con cubreobjetos. Al trabajar con fluorescencia, es importante que los portaobjetos inmunoteñidos se almacenen en cajas oscuras hasta su visualización para evitar la pérdida de fluorescencia.

Tabla IV.2. Anticuerpos secundarios empleados para las tinciones inmunohistoquímicas realizadas en la presente Tesis Doctoral.

Anticuerpo	Fluoróforo	Casa comercial	Número de catálogo
Tinciones simples:			
IgG de cabra anti-conejo	Alexa Flúor 488	Invitrogen	A-11034
Tinciones dobles:			
IgG de cabra anti-ratón	FITC	Bio-Rad	STAR120F
IgG de cabra anti-conejo	Texas-Red	Bio-Rad	103007
IgG de cabra anti-ratón	Alexa Flúor 594	Invitrogen	A-11005
IgG de cabra anti-conejo	Alexa Flúor 488	Invitrogen	A-11034
IgG de asno anti-cabra	Alexa Flúor 488	Invitrogen	A-11055

Procedimiento:

1) Desparafinización y rehidratación

- Someter a los cortes histológicos colocados en portaobjetos a los siguientes baños sucesivos:
 - Xileno/Ottix Plus 3 x 3-5 min a temperature ambiente
 - EtOH 100% 2 x 2 min a temperature ambiente
 - EtOH 100% 30 s a temperature ambiente
 - EtOH 95% 30 s a temperature ambiente
 - EtOH 85% 30 s a temperature ambiente
 - EtOH 70% 30 s a temperature ambiente
 - EtOH 50% 30 s a temperature ambiente
 - EtOH 30% 30 s a temperatura ambiente
 - NaCl 0,85% 5 min a temperatura ambiente
 - PBS 1x 2 x 10 min a temperatura ambiente

2) Bloqueo de uniones inespecíficas

- Sumergir los cortes en solución de bloqueo (0,2% Tritón X-10, 0,5% leche desnatada o BSA en polvo en PBS 1x).
- Incubar durante 45 min a temperatura ambiente en balanceo.

3) Incubación con anticuerpo primario

- Secar ligeramente los portaobjetos con cuidado de no tocar los cortes y colocarlos sobre una superficie plana.
- Aplicar a cada uno de ellos 200-250 µl de solución de anticuerpo/s primario/s disuelto/s en PBS 1x + 0,5% leche descremada en polvo (relación 1:200, en la

presente Tesis). Destinar algunos portaobjetos para actuar como control, a los que se aplica la misma solución de disolución de los anticuerpos pero carente de los mismos.

- Incubar durante 60 min o hasta el día siguiente a temperatura ambiente en ambiente húmedo.

4) Lavado

- Realizar dos lavados de los portaobjetos con PBS 1x de 10 min cada uno.
- Realizar un lavado de los portaobjetos con PBS 1x + 0,2% Tritón X-100 de 5 min.

5) Incubación con anticuerpo secundario

- Secar ligeramente los portaobjetos con cuidado de no tocar los cortes y colocarlos sobre una superficie plana.
- Aplicar a todos los portaobjetos (incluidos los controles) 200-250 µl de solución de anticuerpo/s secundario/s disuelto/s en PBS 1x + 0,5% leche descremada en polvo (relación 1:2000-1:2500, en la presente Tesis). Aplicar solución igualmente a los portaobjetos destinados como control.
- Incubar durante 60-90 min a temperatura ambiente en ambiente húmedo, protegiendo de la luz.

6) Lavado

- Realizar dos lavados de los portaobjetos con PBS 1x de 10 min cada uno, protegiendo de la luz.
- Realizar un lavado de los portaobjetos con PBS 1x + 0,2% Tritón X-100 de 5 min, protegiendo de la luz.

7) Adición de DAPI y montaje

- Secar nuevamente los portaobjetos y añadir una gota de medio fijador de montaje conteniendo DAPI (*Vectashield* o *Fluoroshield*) al centro de cada uno.
- Cubrir cuidadosamente con un cubreobjetos y sellar los bordes con laca de uñas.
- Dejar secar durante al menos 4 h a 4°C antes de proceder a la visualización de la fluorescencia, siempre protegiendo de la luz.

IV.4. Visualización de fluorescencia y tratamiento de imágenes

La detección de las uniones antígeno-anticuerpo en inmunofluorescencia se basa en las propiedades de los fluoróforos de emitir luz visible cuando se les ilumina con una determinada longitud de onda (Robinson *et al.*, 2009). Así, cuando la muestra tratada con un anticuerpo marcado con un fluoróforo es expuesta a una fuente de luz de onda corta (ultravioleta o azul) seleccionada por medio de un monocromador, esta luz genera un

fenómeno de fluorescencia en la molécula marcadora que a su vez emite luz a una longitud de onda más larga (verde, amarillo o naranja), que puede ser cuantificada por fotometría o, en el caso de preparados histológicos, puede ser observada con un microscopio de fluorescencia que, acoplado a una cámara fotográfica, permite la captura de imágenes.

En los trabajos de la presente Tesis Doctoral, se tomaron fotografías del canal de emisión azul para observación de los núcleos celulares teñidos con DAPI, del rojo para observación de la señal de ghrelina, GOAT y GHS-R1a marcada con Texas-Red o Alexa Flúor 594, y del verde para la señal de ghrelina, enzimas digestivas, transportadores de glucosa u hormonas gastrointestinales marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o Alexa Flúor 488. A continuación, las fotografías tomadas se maquetaron utilizando el *software* Photoshop CS6.

Bibliografía

- Buchwalow IB, Böcker W (2010a) Probes processing in immunohistochemistry. En: *Immunohistochemistry: basics and methods*. Springer, Heidelberg, Alemania. pp. 19-30.
- Buchwalow IB, Böcker W (2010b) Working with antibodies. En: *Immunohistochemistry: basics and methods*. Springer, Heidelberg, Alemania. pp. 31-40.
- Coons AH (1971) The development of immunohistochemistry. *Ann N Y Acad Sci* 177: 5-9.
- Robinson JP, Sturgis J, Kumar GL (2009) Immunofluorescence. En: *Immunohistochemical staining methods. Fifth edition* (GL Kumar y L Rudbeck, eds), Dako North America, Carpintería, Estados Unidos. pp. 61-65.
- Rolls G (2010) *Microtomy and paraffin section preparation*. Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania. 36 pp.
- Sainte-Marie G (1962) A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochem Cytochem* 10: 250-256.
- Wick G, Traill KN, Schauenstein K (1982) *Immunofluorescence technology: selected theoretical and clinical aspects*. Elsevier Biomedical Press, Michigan, Estados Unidos. 442 pp.

ENZIMOINMUNOENSAYO

El enzimoimmunoensayo o ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es un método sencillo y de gran especificidad que permite detectar y cuantificar un compuesto específico, habitualmente de naturaleza proteica o esteroide, presente en una mezcla compleja. Originalmente descrita en 1971 por los científicos suecos Eva Engvall y Peter Perlmann (Engvall y Perlmann, 1971), la técnica se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) insolubilizado sobre un soporte inmunoabsorbente (generalmente una placa de 96 pocillos tratada con compuestos como el poliestireno o el polivinilo), la reacción antígeno-anticuerpo queda inmovilizada y, por tanto, puede ser fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico sobre el que pueda actuar la enzima dando lugar a un color observable y cuantificable mediante colorimetría o espectrofotometría (Voller, 1978).

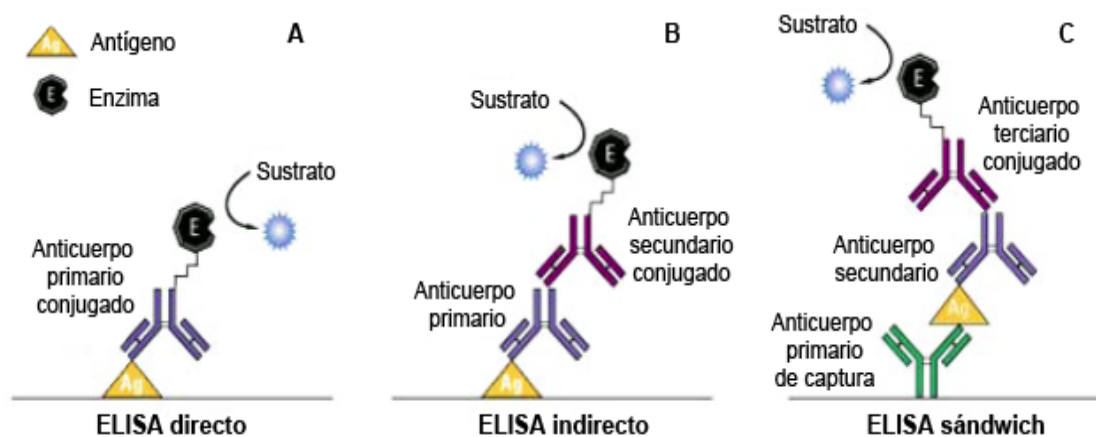


Figura V.1. Principales variantes de la técnica de ELISA. A) ELISA directo. La placa se incuba con la muestra a analizar y los antígenos presentes en ella quedan inmovilizados en la misma. La detección del antígeno deseado se basa en la adición de un anticuerpo específico marcado. B) ELISA indirecto. La placa se incuba de igual forma a la anterior, pero el sistema de detección implica el uso de dos anticuerpos: uno primario específico contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primero. C) ELISA sándwich. La placa se incuba con un anticuerpo primario específico del antígeno de interés, que quedará unido a dicho anticuerpo tras la adición de la muestra. La detección se lleva a cabo mediante la adición de un anticuerpo anti-antígeno que puede encontrarse marcado o sin marcar, en cuyo caso se requiere la actuación de un tercer anticuerpo marcado.

En la presente Tesis Doctoral, la técnica de ELISA se ha empleado como herramienta para la cuantificación de los niveles de ghrelina, en sus dos formas acilada y desacilada, y de

GOAT presentes en muestras de plasma o suero de carpín mediante el empleo de kits comerciales. Los kits empleados han sido especialmente diseñados para la detección de las proteínas mencionadas en muestras biológicas de peces (MyBioSource). En la presente Tesis Doctoral se ha empleado la variante conocida como ELISA sándwich (**Figura V.1**). La técnica ha sido realizada en el laboratorio principal de realización de la Tesis y en el laboratorio del Doctor Suraj Unniappan en la Universidad de Saskatchewan (Saskatoon, Canadá).

V.1. ELISA sándwich

Este tipo de ELISA se caracteriza porque presenta los pocillos de la placa soporte recubiertos con un primer anticuerpo específico contra el antígeno a detectar. Tras la adición de la muestra y la retención del antígeno a dicho anticuerpo, se añade una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno (con un epítipo diferente al del anticuerpo con el que se encuentra tapizado el soporte). Este segundo anticuerpo (en los ELISAs sándwich dobles o “DAS”), o un tercero (en los ELISAs sándwich heterólogos o “HADAS”), se encuentra conjugado con una enzima marcadora. Así pues, cada molécula de antígeno estará unida a un primer anticuerpo en la base que lo retiene y al menos a un segundo anticuerpo que lo marca; de ahí el nombre de sándwich. Las enzimas marcadoras más utilizadas son la HRP, la fosfatasa alcalina o la β -galactosidasa, capaces de actuar sobre un sustrato específico que se añade a continuación, dando lugar a un producto final coloreado que es cuantificado mediante espectrofotometría. En el caso de los ensayos empleados en la presente Tesis, se utilizó el sistema HRP, que reduce el peróxido de hidrógeno generando oxígeno que oxida a su vez a otros compuestos cromógenos, en este caso la tetrametilbencidina (TMB) cuya oxidación genera un producto de color azul oscuro. La intensidad de color será proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. La realización de una curva patrón con concentraciones conocidas de antígeno permitirá extrapolar los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra y así conocer la cantidad de antígeno presente en cada una de ellas (Cox *et al.*, 2012).

Procedimiento:

Se detalla el protocolo seguido para la determinación de AG, DAG y GOAT en muestras biológicas de peces empleando kits comerciales específicos de la casa comercial MyBioSource (**Figura V.2**). Este procedimiento puede verse modificado según el antígeno a detectar o la casa comercial.

- 1) Atemperar los reactivos y muestras a temperatura ambiente durante 30 min antes de iniciar el ensayo.
- 2) Diluir un volumen de solución de lavado (20x) en 19 volúmenes de agua destilada.
- 3) Determinar los pocillos que actuarán como blanco/control, estándares y muestras, y añadir (por duplicado) 50 µl de diluyente de muestras a los pocillos control, 50 µl de cada estándar a los pocillos estándar y 50 µl de cada muestra a los pocillos correspondientes.
- 4) Añadir a cada pocillo 100 µl de solución de anticuerpo anti-antígeno conjugado con HRP.
- 5) Incubar durante 60 min a 37°C.
- 6) Realizar cuatro lavados de la placa con 350 µl de solución de lavado 1x por pocillo y por lavado.
- 7) Añadir a cada pocillo 50 µl de solución de cromógeno A (peróxido de hidrógeno), seguido de 50 µl de solución de cromógeno B (TMB). Agitar ligeramente la placa.
- 8) Proteger de la luz e incubar durante 15 min a 37°C.
- 9) Parar la reacción añadiendo a cada pocillo 50 µl de solución de parada (HCl). Esto hará que el color azul de las reacciones vire a amarillo.
- 10) Leer absorbancia a 450 nm dentro de los 15 min posteriores a la parada de la reacción.

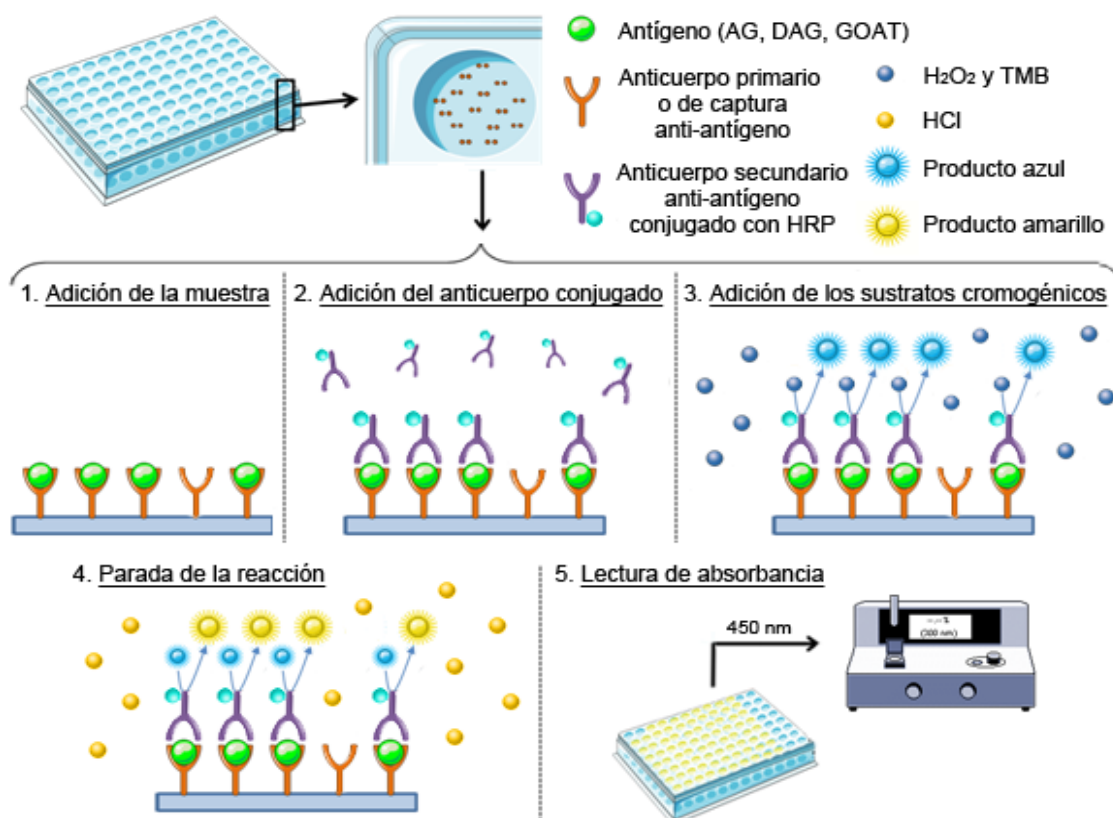


Figura V.2. Esquema representativo de los ensayos ELISA para la determinación de ghrelina acilada (AG), ghrelina desacilada (DAG) y GOAT en muestras de plasma de carpín. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo específico de cada antígeno. 1. Se añade la muestra a cada pocillo, uniéndose el antígeno a detectar en cada caso al anticuerpo primario. 2. Se añade un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado con HRP. 3. La adición de los sustratos de la HRP (peróxido de hidrógeno y TMB) da lugar a un producto de color azulado cuya intensidad será proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. 4. Se para la reacción añadiendo solución de parada (HCl), que torna el producto azulado en amarillo manteniendo la relación de intensidad de color y cantidad de antígeno. 5. Esta coloración es cuantificada finalmente mediante el uso de un espectrofotómetro.

Bibliografía

- Cox KL, Devanarayan V, Kriauciunas A, Manetta J, Montrose C, Sittampalam S (2012) Immunoassay methods. En: *Assay guidance manual* (GS Sittampalam, NP Coussens, H Nelson *et al.*, eds), Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, Estados Unidos.
- Engvall E, Perlmann P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874.
- Voller A (1978) The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). *Ric Clin Lab* 8: 289-298.

TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN GENÉTICA: CRISPR-CAS9

Cuando los científicos comprendieron la estructura de los genes y cómo la información que portaban se traducía en funciones o características, comenzaron a buscar la forma de aislarlos, analizarlos, modificarlos y hasta transferirlos de un organismo a otro para conferirle una nueva característica. En ese contexto surge la ingeniería o manipulación genética, que se podría definir como la tecnología del control y transferencia de ADN de un organismo a otro, es decir, la capacidad de añadir un nuevo ADN o modificar uno ya existente en un organismo con el fin de modificar el caudal hereditario (Turksen, 2016). De esta forma, se consigue tener nuevas características que naturalmente no existen o modificar alguna ya existente. Los organismos que resultan modificados mediante ingeniería genética reciben el nombre de organismos genéticamente modificados o transgénicos y, entre ellos, si la modificación introducida da lugar a la inactivación de un gen se habla de organismos nulos o *knockout* y si conduce a una reducción de la expresión génica (silenciamiento génico) se habla de organismos *knockdown*. La ingeniería genética nace con los trabajos de los científicos Herbert Boyer y Stanley Cohen (Cohen *et al.*, 1973), y ha supuesto un gran avance para la investigación científica. Hoy en día sus aplicaciones se extienden a una gran diversidad de campos.

Entre los diversos métodos de manipulación de la información genética, el sistema CRISPR-Cas9 ha supuesto una revolución en la tecnología de edición genómica. Las bases de este mecanismo se encuentran en el sistema homónimo que presentan las bacterias para defenderse frente a elementos genéticos externos como plásmidos y virus (Mojica *et al.*, 1993; Bhaya *et al.*, 2011; Horvath y Barrangou, 2011; Gonzales y Yeh, 2014). Muchos microorganismos, sobre todo las arqueas, presentan en su genoma loci de ADN caracterizados por contener repeticiones cortas y palindrómicas de ADN separadas entre sí mediante secuencias cortas variables llamadas protoespaciadores, los cuales a su vez presentan una secuencia adyacente conservada que actúa como líder, denominada motivo adyacente a los protoespaciadores (PAM). Estos loci de repeticiones palindrómicas reciben el nombre de CRISPRs (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o, en español, Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas) y se encuentran frecuentemente asociadas con unos genes que codifican para un grupo de proteínas, principalmente endonucleasas, conocidas como Cas (*CRISPR associated protein*).

El funcionamiento del sistema CRISPR-Cas procariota es, de forma resumida, el siguiente. Cuando un virus entra dentro de una bacteria interactúa con distintos componentes celulares y toma el control de la maquinaria celular. Sin embargo, las bacterias que tienen este sistema de defensa poseen un complejo formado por una proteína Cas y un dúplex formado por el ARN transcrito a partir de las secuencias CRISPR (crARN) junto a otro ARN pequeño denominado ARN transactivador (tracrARN) que, si interactúa con el material genético del virus, es capaz de inactivarlo y posteriormente degradarlo. Además, las proteínas Cas tienen la capacidad de modificar una pequeña parte del ADN viral e integrarlo dentro del conjunto de secuencias CRISPR, de forma que si esa bacteria (o su descendencia) se encuentra con ese mismo virus, inactivará de forma más eficiente al material genético viral.

En el año 2013, las científicas Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier fueron capaces de convertir esta maquinaria biológica natural de los organismos procariotas en una herramienta molecular capaz no sólo de editar el material genético de cualquier organismo sino de dirigir la edición a una posición específica de un ADN (Charpentier y Doudna, 2013; Doudna y Charpentier, 2014). La edición genómica del ADN mediante la tecnología CRISPR-Cas9 incluye dos etapas fundamentales (**Figura VI.1**). En una primera etapa, un complejo artificial formado por crARN y tracrARN denominado ARN guía se inserta junto a la nucleasa Cas9 en una célula y se asocian. El ARN guía es específico de una secuencia concreta del ADN, de manera que por las reglas de complementariedad de nucleótidos se hibridará en esa secuencia y guiará a la nucleasa hacia el sitio diana de mutación. Entonces actúa Cas9 que, tras reconocer una secuencia PAM en la hebra de ADN adyacente al ARN guía, rompe un enlace en la cadena de los ácidos nucleicos cortando así el ADN. En una segunda etapa se activan al menos dos mecanismos naturales de reparación del ADN cortado. El primero, denominado mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ), promueve mutaciones de inserción o deleción (también llamadas mutaciones InDel), dando lugar a que, después del sitio de corte, bien aparezca un hueco en la cadena o bien se inserte una pequeña porción adicional. Este tipo de reparación puede resultar en mutaciones InDel aleatorias y, por tanto, en cambios en la pauta de lectura que pueden generar codones de terminación prematuros. Por su parte, el segundo mecanismo, conocido como vía de reparación directa por homología (HDR), permite la incorporación de una secuencia adicional y concreta exactamente en el sitio original de corte, para lo cual se debe proporcionar a la célula un molde de reparación que se integrará en el ADN. Este mecanismo es capaz de dar lugar a una edición precisa y rigurosa del lugar de corte. En cualquiera de los casos, los mecanismos de reparación producen una edición del material genético del

organismo, generando un organismo genéticamente modificado (Ran *et al.*, 2013; Gagnon *et al.*, 2014).

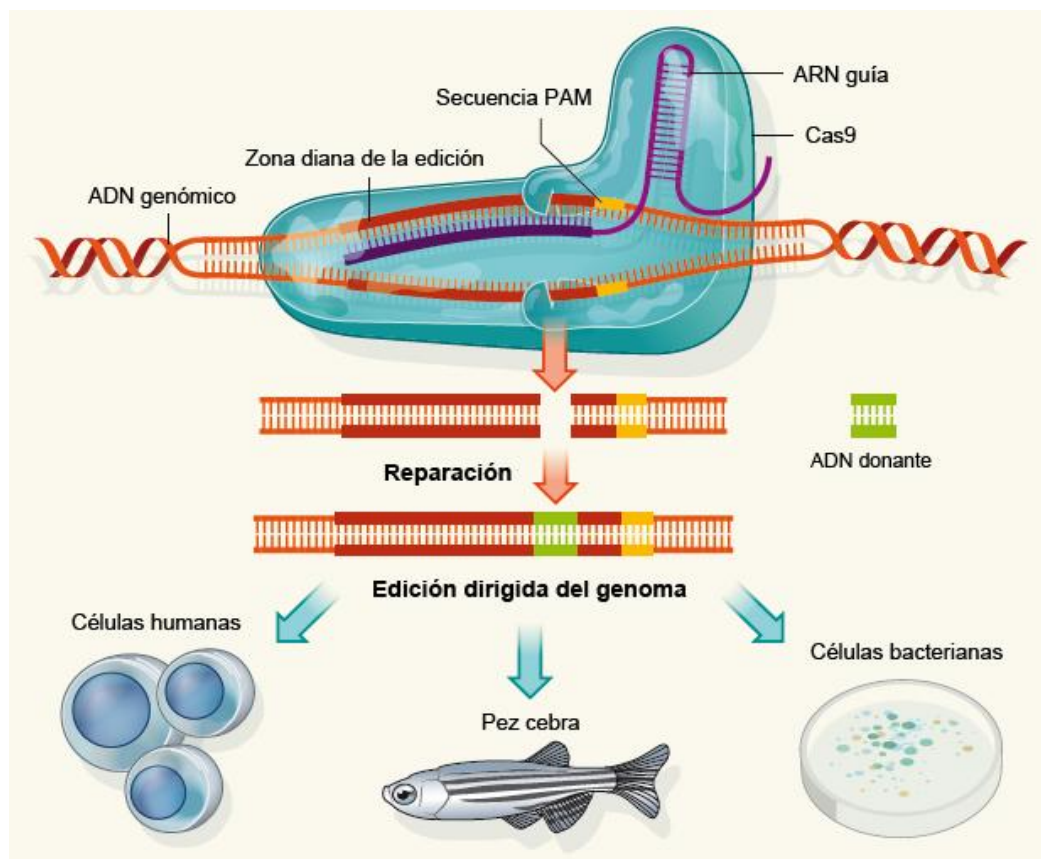


Figura VI.1. Edición del genoma mediante la tecnología CRISPR-Cas9. Cas9 es una endonucleasa de ADN que presenta dos sitios activos, cada uno de los cuales corta una de las cadenas del ADN. La enzima es guiada hacia el ADN diana a editar mediante una molécula de ARN que contiene una secuencia que coincide con la secuencia a escindir. De esta manera, la actividad Cas9 provoca cortes en lugares específicos del ADN que luego son reparados por recombinación homóloga o no homóloga. La recombinación homóloga permite la inserción de nuevos fragmentos de ADN en la secuencia original. En cualquiera de los casos, los mecanismos de reparación dan lugar a la modificación del genoma de un organismo. Modificado de Charpentier y Doudna, 2013.

En la presente Tesis Doctoral se ha utilizado la tecnología CRISPR-Cas9 con el fin de obtener ejemplares de peces cebra nulos o *knockout* para el gen codificante de ghrelina, lo que supone la obtención de modelos animales de gran valor para el estudio de numerosos aspectos funcionales del sistema ghrelinérgico de los peces teleósteos. Esta tecnología ha sido empleada en numerosas ocasiones para la edición genómica en los peces cebra, tratándose por tanto de una metodología validada para la obtención de una edición precisa y eficiente en dicho modelo animal (Hwang *et al.*, 2013; Gonzales y Yeh, 2014; Irion *et al.*, 2014). Las técnicas que se describen a continuación han sido realizadas en el laboratorio del Doctor José Miguel Cerdá-Reverter en el Instituto de Acuicultura Torre de la Sal del CSIC (Castellón, España).

VI.1. Dirección de la edición genómica: Selección del sitio diana de mutación y diseño del molde de reparación

La tecnología CRISPR-Cas9 es una herramienta de edición genómica que puede ser en gran medida dirigida. En primer lugar, permite la selección de la posición específica dentro de la secuencia génica diana hacia la cual se quiera dirigir la edición, dirección que viene dada por la especificidad del ARN guía. Por otro lado, el mecanismo de reparación de ADN por HDR permite la integración en el genoma de una secuencia molde diseñada con las modificaciones deseadas, lo que es capaz de resultar, potencialmente, en cualquier tipo de mutación controlada y dirigida.

VI.1.1. Diseño del ARN guía

El ARN guía, si bien consiste en un componente de ARN dúplex formado por crARN y tracrARN, es diseñado inicialmente como un cebador estándar a partir del cual se generará posteriormente dicho complejo. En este apartado se detallan los pasos a seguir para el diseño del cebador de un ARN guía; el procedimiento para su posterior preparación se indica en el apartado siguiente. El cebador del ARN guía presenta la siguiente estructura (Gagnon *et al.*, 2014):

SECUENCIA PROMOTOR + SECUENCIA GUÍA + REGIÓN CONSTANTE

La *secuencia promotor* se corresponde con la secuencia de un promotor que haga posible la transcripción *in vitro* del ARN guía. Suele consistir en la secuencia del promotor T7 (TAATACGACTCACTATA) o del promotor SP6 (ATTTAGGTGACACTATA). En cualquier caso, es constante para todos los ARNs guía.

La *secuencia guía* es la región propiamente dicha del ARN guía que reconocerá al gen diana en la posición específica a la cual se pretende dirigir la edición, constituyendo la única porción variable de un ARN guía. Esta secuencia consiste en 20 nucleótidos del gen diana, pertenecientes a una zona del gen que codifique para aminoácidos de funcionalidad importante en la proteína, y debe cumplir dos características generales: su contenido de G+C debe ser superior al 50% y debe preceder a un triplete 5'-NGG en la secuencia génica. Ese triplete se corresponde con la secuencia PAM, y no formará parte de la secuencia final del ARN guía, pero es imprescindible para la unión del complejo Cas9 al ADN y, por tanto, para que pueda tener lugar el corte de las cadenas. Debe tenerse en consideración, asimismo, que la secuencia guía sea capaz de reconocer únicamente al gen interés y no presente genes diana adicionales u *off-targets*. La secuencia guía puede ser diseñada manualmente o empleando herramientas bioinformáticas, como *CHOP-CHOP* (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>).

Por último, la *región constante* consiste en una secuencia invariable de nucleótidos (GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG) complementaria al denominado oligonucleótido constante. Este oligonucleótido (de secuencia AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTC AAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC) codifica para la secuencia reversa complementaria de una región del tracrARN, de manera que permite que se genere la construcción dúplex entre el crARN y el tracrARN. El tracrARN es un elemento necesario para el reconocimiento y programación de la Cas9, por lo que la región constante del ARN guía está jugando un papel importante en la interacción entre él y la Cas9.

VI.1.2. Diseño del molde de reparación

El molde de reparación puede presentarse en forma de construcción de ADN bicatenario (plásmidos) u oligonucleótido de ADN monocatenario, en ambos casos con sendas secuencias de homología con el ADN diana flanqueando la secuencia de inserción. Este molde puede ser diseñado con cualquier modificación deseada con el fin de generar mutaciones puntuales y controladas (Ran *et al.*, 2013). En la tecnología CRISPR-Cas9 utilizada en la presente Tesis Doctoral se empleó como molde de reparación un oligonucleótido de ADN monocatenario portador de codones de terminación en los tres marcos de lectura, denominado por ello casete de parada, lo que hace posible dirigir la edición genómica de manera que impida la lectura durante la traducción de la proteína codificada en el gen diana. El casete de parada se diseñó en base a una secuencia de nucleótidos invariable (GTCATGGCGTTTAAACCTTAATTAAGCTGTTGTAG) flanqueada a cada lado por 20 nucleótidos homólogos a la zona diana de edición genómica (Gagnon *et al.*, 2014).

VI.2. Generación del ARN guía

Los dos elementos constituyentes del ARN guía (crARN y tracrARN) pueden construirse en forma de dúplex de igual manera en la que se pueden encontrar en su estado natural, pero su utilización en el sistema CRISPR-Cas9 requiere su fusión para dar lugar a una quimera en forma de una sola cadena con un lazo de unión entre los dos elementos, que es lo que pasa a recibir la denominación de ARN guía. Esto implica inicialmente la formación de un molde entre el ARN guía y el oligonucleótido constante (véase el apartado VI.1.1) para que pueda tener lugar a continuación la transcripción *in vitro* del conjunto alineado (Gagnon *et al.*, 2014).

Procedimiento:**1) Alineamiento del ARN guía con el oligonucleótido constante**

- Preparar una mezcla con los siguientes componentes:

ARN guía 100 μ M	1 μ l
Oligonucleótido constante 100 μ M	1 μ l
H ₂ O libre de nucleasas	8 μ l

- Incubar con el siguiente protocolo:

95°C _____ 5 min
 95°C a 85°C — -2°C/s
 85°C a 25°C — -0,1°C/s

2) Polimerización con T4 ADN polimerasa

- Agregar al tubo de ARN guía y oligonucleótido constante alineado los siguiente componentes:

H ₂ O libre de nucleasas	5 μ l
Tampón o <i>buffer</i> 10x (Tris-acetato 250mM, acetato potásico 1M, acetato magnésico 100mM, DTT 10mM)	2 μ l
dNTPs 10mM	2,5 μ l
T4 ADN polimerasa (Promega M831A)	0,5 μ l

- Incubar durante 5 min a 37°C.

3) Purificación de ADN

- Purificar el ADN obtenido empleando un kit de purificación comercial (Macherey Nagel, en este caso) siguiendo las especificaciones del fabricante.
- Cuantificar la concentración de ADN obtenida.

4) Transcripción del ARN guía con T7 ARN polimerasa

Se empleó el kit comercial “*HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis kit*” (New England BioLabs)

- Preparar una mezcla con los siguientes componentes:

ADN polimerizado	200-500 ng
Tampón o <i>buffer</i> NTP	5 μ l
T7 polimerasa	1 μ l
H ₂ O libre de nucleasas	Hasta completar un volumen de 15 μ l

- Incubar como mínimo 16 horas a 37°C.
- Añadir 1,5 μ l de ADNasa 1 y 22,5 μ l de H₂O libre de nucleasas
- Incubar durante 15 min a 37°C.

5) Extracción y purificación de ARN

- Extraer el ARN empleando un kit comercial (Qiagen, en este caso) siguiendo las especificaciones del fabricante.

- Cuantificar la concentración de ARN obtenida.
- Almacenar a -80°C en alícuotas de 2 µg de ARN.

VI.3. Generación de la Cas9

Tanto el ARNm de Cas9 como la proteína generan altas tasas de mutagénesis al ser inyectadas en una célula. En el caso de los trabajos incluidos en la presente Tesis, se empleó ARNm obtenido a partir del plásmido comercial pT3TS-nCas9n (AddGene). Su preparación implica, de manera simplificada, la transcripción del ARNm de la Cas9 a partir del plásmido linealizado y la extracción y purificación del correspondiente ARN (Gagnon *et al.*, 2014).

Procedimiento:

1) Transformación y crecimiento del plásmido pT3Ts-nCas9n

- Transformar el plásmido en bacterias competentes y crecerlas en medio sólido y líquido siguiendo un protocolo estándar, como el detallado en el Anexo metodológico II (apartado II.7.3).
- Extraer ADN plasmídico siguiendo un protocolo convencional de *miniprep* (también detallado en el Anexo metodológico II, apartado II.7.4).

2) Linearización del plásmido

- Preparar una mezcla con los siguientes componentes:

ADN plasmídico	10 ml
Tampón o <i>buffer</i> 10x	8 ml
Enzima de restricción (XbaI)	2 ml
H ₂ O estéril	20 µl
- Incubar durante 1 hora a 37°C.
- Comprobar linearización mediante una electroforesis en gel de agarosa (apartado II.6.2 del Anexo metodológico II).
- Purificar ADN empleando un kit de purificación en columna.

3) Transcripción del ARNm de Cas9 con T3 polimerasa

Se empleó el kit comercial “*mMessage Machine T3 Transcription kit*” (Ambion)

- Preparar una mezcla con los siguientes componentes:

ADN linearizado	Máximo 1 µg
Tampón o <i>buffer</i> 10x	2 µl
2x NTP/Cap	10 µl
Mix T3 polimerasa	2 µl
H ₂ O libre de nucleasas	Hasta completar un volumen de 20 µl
- Incubar durante 2,5 horas a 37°C.
- Añadir 1 µl de ADNasa (Turbo mix).

- Incubar durante 15 min a 37°C.

4) Extracción y purificación de ARN

- Extraer y purificar el ARN, preferentemente empleando un kit comercial (Qiagen, en este caso) siguiendo las especificaciones del fabricante.
- Cuantificar la concentración de ARN obtenida.
- Almacenar a -80°C en alícuotas de 2 µg de ARN.

VI.4. Introducción del ARN guía, Cas9 y molde de reparación en peces cebra mediante microinyección directa de huevos fecundados

El siguiente paso al diseño y generación de los elementos constituyentes de la tecnología CRISPR-Cas9 es su transferencia al organismo que se pretende mutagenizar. Si el mismo es unicelular, la transferencia puede hacerse directamente sobre el organismo, mientras que si es pluricelular, debe llevarse a cabo sobre células aisladas del organismo o sobre cigotos. Para el último caso es necesario la previa reproducción de dos individuos adultos y la consecuente recolección de los huevos fecundados (descrito en el apartado I.2 del Anexo metodológico I). Entre los procedimientos tradicionales de transferencia genética en organismos pluricelulares, el más empleado, llevado a cabo en la presente Tesis, es la microinyección. Esta técnica consiste en la introducción del material de inyección directamente en la porción celular de cada cigoto mediante la utilización de una aguja de punta fina (obtenida en este caso a partir de un microcapilar) conectada a un microinyector y una fuente de aire que han sido previamente ajustados para liberar el volumen de inyección deseado (**Figura VI.2**). Es importante que la microinyección tenga lugar en estadio unicelular, es decir, antes de la primera división celular, de modo que todas las células del animal contengan la modificación deseada. Tras la microinyección, los cigotos fueron criados como se describe en el apartado I.2 del Anexo metodológico I.

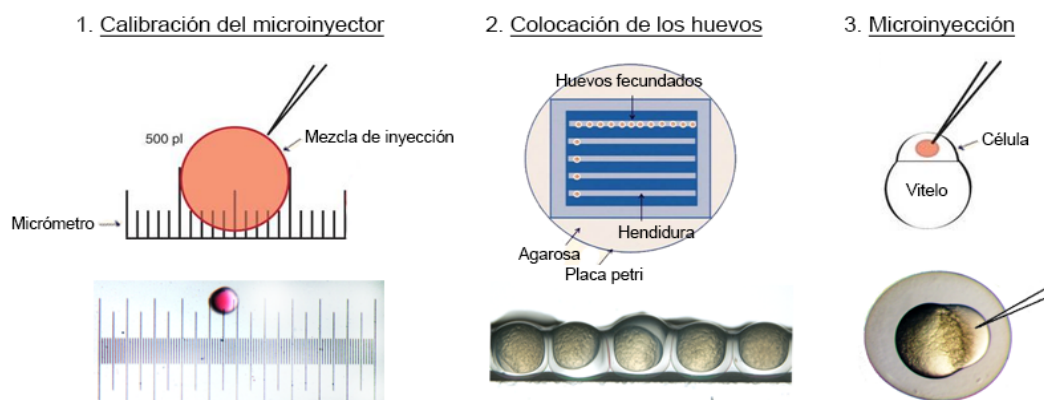


Figura VI.2. Representaciones esquemáticas e imágenes del proceso de microinyección de huevos de pez cebra fecundados. 1. El primer paso consiste en la calibración del microinyector colocando una

gota de aceite mineral en un micrómetro. Un volumen de inyección de 500 pl presenta un diámetro de 0,1 mm. 2. Los huevos fecundados a inyectar se colocan de manera alineada en un molde de agar con hendiduras. 3. Se procede a la microinyección de cada cigoto perforando la superficie del corion y penetrando en la célula de un solo golpe suave.

Procedimiento:

- 1) Preparar la mezcla de inyección conteniendo los siguientes componentes:

ARN guía	1-2 µg
Cas9	2 µg
Casete de parada 3µM	1 µl
Rojo fenol	2 µl
H ₂ O libre de nucleasas	Hasta completar un volumen de 10 µl

- 2) Calibrar el sistema de microinyección empleando un micrómetro al que se colocó una gota de aceite mineral en el centro. El sistema estará calibrado cuando al inyectar resulte una gota de 0,1 mm de diámetro, lo que contiene 500 pl de material de inyección.
- 3) Colocar los huevos fecundados de manera alineada en un molde de agar con hendiduras para evitar que se desplacen.
- 4) Proceder a la microinyección de cada cigoto perforando la superficie del corion y penetrando en la célula de un solo golpe suave. El rojo fenol presente en la mezcla de inyección permitirá visualizar que la microinyección se ha realizado en la posición correcta.
- 5) Con ayuda de un caudal suave de agua destilada con 3,5 ppm de sal común pasar los cigotos inyectados a una placa Petri conteniendo agua destilada con 3,5 ppm de sal común con unas gotas de azul de metileno.
- 6) Proceder a la cría de los huevos (véase el apartado I.2 del Anexo metodológico I), realizando observaciones diarias durante los primeros 3-5 días del progreso de los huevos y eliminando los no viables.

VI.5. Transferencia genética vertical: Cruces selectivos

Los organismos manipulados genéticamente mediante los procesos de microinyección detallados en el apartado anterior son organismos que, gracias a la tecnología CRISPR-Cas9, presentan una mutación en el gen de interés, la cual, dado que la microinyección tuvo lugar en el estadio de cigoto unicelular, ha sido transmitida a las células. Estos individuos pertenecientes a una primera generación (F₀) reciben el nombre de fundadores. No obstante, si bien la técnica CRISPR-Cas9 permite dirigir en gran medida la edición genómica, las mutaciones que pueden haber sido generadas en los individuos fundadores pueden no ser idénticas en todos ellos. Por ello, la generación de individuos genéticamente modificados con

las mismas características de interés requiere una serie de cruces selectivos que permitan establecer una línea estable. De esta manera se está produciendo una transferencia genética vertical, término que hace referencia a cualquier proceso mediante el cual se transfiere material genético de un organismo a su descendencia.

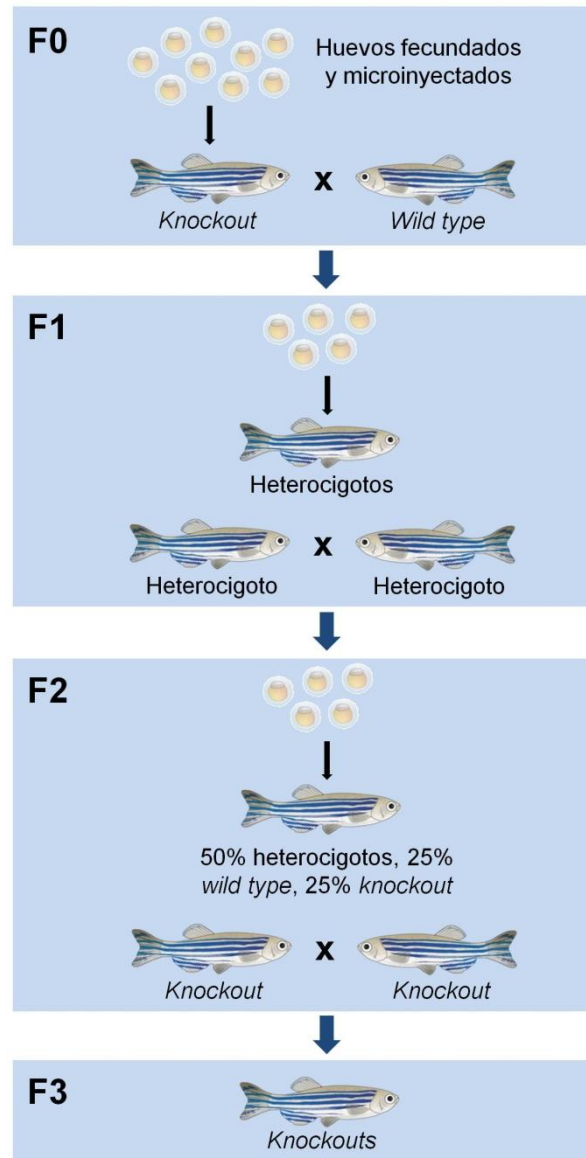


Figura VI.3. Esquema de los cruces selectivos necesarios para la generación de una línea estable de individuos *knockouts* mediante la tecnología CRISPR-Cas9.

Los cruces a llevar a cabo durante el desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas9 para la generación de líneas *knockout* estables (esquematisados en la **Figura VI.3**) requieren el genotipado previo de cada individuo a cruzar, excepto en el caso de individuos salvajes o *wild type*. Los procesos de genotipado (descritos a continuación) van a permitir la selección de los individuos que se necesite reproducir en cada generación. El primer paso es el cruce de un individuo *knockout* de la F₀ (previamente genotipado para comprobarse la presencia de

mutación) con un individuo salvaje, lo que producirá una generación F_1 compuesta por una totalidad de individuos heterocigotos. El genotipado de estos individuos permitirá identificar el tipo de mutación que la tecnología CRISPR-Cas9 ha generado en el genoma. A continuación, dos ejemplares heterocigotos de la F_1 portadores de la misma mutación han de ser cruzados. Este cruce dará lugar a una generación F_2 compuesta, según las leyes de la herencia mendeliana (Winsor, 1988), por un 50% de individuos heterocigotos, un 25% de individuos homocigotos salvajes y un 25% de individuos *knockout*. Estos últimos, portadores de la mutación presente en sus progenitores, deberán ser identificados mediante nuevos procesos de genotipado. Por último, el cruce entre dos individuos *knockout* pertenecientes a la F_2 dará lugar a una línea estable (F_3) compuesta por la totalidad de individuos genéticamente modificados. El proceso a seguir durante los cruces aparece detallado en el apartado I.2 del Anexo metodológico I. En la fase final de la presente Tesis Doctoral, no ha sido posible realizar todos los cruces necesarios para obtener una línea estable *knockout* pues los peces se encuentran en etapa de crecimiento. Por ello, los estudios preliminares incluidos han sido realizados empleando individuos de la F_0 .

VI.6. Análisis de mutagénesis inducida por CRISPR-Cas9: Genotipado

El genotipado, también llamado genotipificación o caracterización genética, consiste en la determinación de la información genética específica de un organismo, persiguiendo el análisis de las variaciones individuales que existen en la secuencia de ADN con el fin de identificarlo y poder diferenciarlo del resto. En el caso del genotipado de individuos transgénicos, como el presente, se suele llevar a cabo un genotipado parcial destinado a determinar la información genética de una única región genómica, concretamente aquella seleccionada como diana de la edición genómica. Entre los métodos existentes, en los trabajos incluidos en la presente Tesis se empleó fundamentalmente un método de genotipado basado en la caracterización, mediante electroforesis PAGE, de los dúplex formados entre las dos hebras de ADN como resultado de su desnaturalización y alineamiento (Zhu *et al.*, 2014), así como la secuenciación para identificar cada mutación de manera concreta. Estos métodos difieren ligeramente según la generación en cuestión. Como en la presente Tesis únicamente se han incluido estudios realizados con individuos de la F_0 , a continuación se describen los procesos de genotipado en dicha generación.

VI.6.1. Genotipado de individuos de la F_0

Los genotipados en esta generación tienen como objetivo la comprobación de que la tecnología CRISPR-Cas9 está funcionando y produciendo una edición genómica. La primera

comprobación de ello se debe realizar en huevos o larvas a los 2-5 días después de haber sido microinyectados, lo que servirá para determinar el grado de efectividad de la microinyección y, si es necesario, proceder al ajuste de las dosis de microinyección de ARN guía y Cas9. Sin embargo, el pequeño tamaño de los organismos en estas etapas iniciales del desarrollo imposibilita la toma de una pequeña muestra de cada uno, por lo que el genotipado en este punto se debe llevar a cabo sobre la totalidad de un huevo o larva. Esto supone que dicho genotipado, si bien permite conocer el porcentaje de individuos mutantes dentro de la población de huevos microinyectados, no asegura que los huevos criados presenten mutación. Por lo tanto, debe ser repetido en peces de la F_0 de 2-3 meses de edad, momento en el cual es posible extraer una muestra de cola sin necesidad de sacrificar el animal (véase el apartado I.4.3 del Anexo metodológico I para detalles acerca de la toma de muestras). Esto permitirá comprobar que peces adultos de la F_0 efectivamente poseen el material genético editado, tras lo cual se procederá a su cruce con un individuo salvaje, como se detalló en el apartado anterior.

Procedimiento:

1) Extracción de ADN genómico

- Colocar cada muestra de huevo, larva o cola en un eppendorf y retirar cualquier resto agua. Siempre incluir una muestra de un individuo no inyectado (salvaje) para poder efectuar comparaciones.
- Proceder a la extracción de ADN genómico por el método del NaOH (apartado II.1.2 del Anexo metodológico II).

2) PCR con posterior desnaturalización y realineamiento

- Realizar una PCR convencional de cada muestra siguiendo indicaciones descritas en el apartado II.3 del Anexo metodológico II, empleando cebadores diseñados sobre la secuencia génica salvaje del gen de interés de manera que se unan a ambos lados del sitio diana de mutación, cercanos a ella, delimitando un amplicón de unos 200-300 pb (cebadores a los que denominaremos internos o *inner*).
- Finalizada la PCR proceder a una nueva desnaturalización y realineamiento de los fragmentos de ADN mediante incubación de las muestras con el siguiente protocolo:

95°C _____ 5 min
 95°C a 85°C — -2°C/s
 85°C a 25°C — -0,1°C/s

3) Electroforesis PAGE/TBE

- Correr las muestras en una electroforesis en gel de acrilamida con tampón

TBE siguiendo las indicaciones descritas en el apartado II.6.3 del Anexo metodológico II.

4) Comprobación de mutagénesis

- Comparar el patrón de bandas obtenido en cada muestra de organismo microinyectado con el patrón de bandas del organismo salvaje. Un patrón de bandas diferente entre los organismos microinyectados y el salvaje será indicativo de la existencia de una mutación en el genoma. Generalmente estos patrones responderán a una única banda para el organismo salvaje y numerosas bandas o incluso una mancha para los organismos microinyectados. Este hecho se debe a los procesos de desnaturalización y realineamiento de las cadenas de ADN tras ser amplificadas mediante PCR, los cuales en un individuo salvaje, que presenta todos los alelos iguales, el realineamiento da lugar únicamente a dúplex idénticos u homodúplex, mientras que en un individuo *knockout*, que contiene una mezcla de mutaciones InDel y alelos salvajes, genera homodúplex y heterodúplex, que generalmente migran a una velocidad menor que los homodúplex durante una electroforesis PAGE en condiciones nativas.

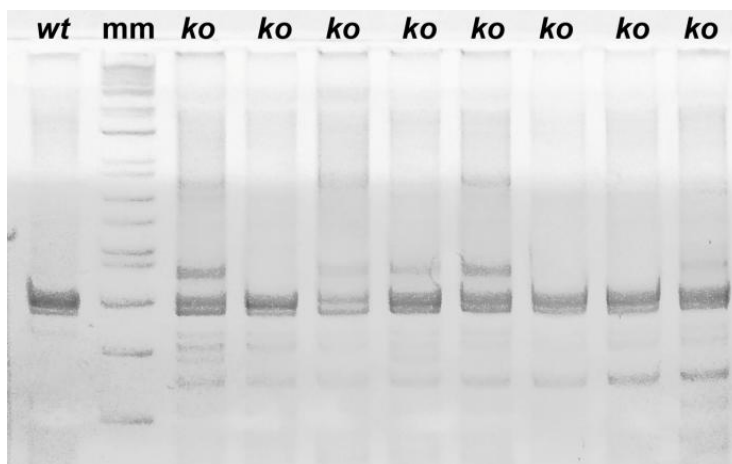


Figura VI.4. Electroforesis PAGE mostrando el genotipado de individuos de pez cebra basado en la caracterización de los dúplex formados entre las dos hebras de ADN como resultado de su desnaturalización y alineamiento. Únicamente dúplex de tipo homodúplex se observan en el individuo salvaje (*wt*), mientras que homodúplex y heterodúplex son detectados en los individuos *knockout* (*ko*). *mm*, marcador molecular.

Bibliografía

- Bhaya D, Davison M, Barrangou R (2011) CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet* 45: 273-297.
- Charpentier E, Doudna JA (2013) Biotechnology: rewriting a genome. *Nature* 495: 50-51.

- Cohen SN, Chang ACY, Boyer HW, Helling RB (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci USA* 70: 3240-3244.
- Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096.
- Gagnon JA, Valen E, Thyme SB, Huang P, Ahkmetova L, Pauli A, Montague TG, Zimmerman S, Richter C, Schier AF (2014) Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS ONE* 9: e98186.
- Gonzales AP, Yeh JR (2014) Cas9-based genome editing in zebrafish. *Methods Enzymol* 546: 377-413.
- Horvath P, Barrangou R (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327: 167-170.
- Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JR, Joung JK (2013) Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 31: 227-229.
- Irion U, Krauss J, Nüsslein-Volhard C (2014) Precise and efficient genome editing in zebrafish using the CRISPR/Cas9 system. *Development* 141: 4827-4830.
- Mojica FJ, Juez G, Rodríguez-Valera F (1993) Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol* 9: 613-621.
- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott A, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Prot* 8: 2281-2380.
- Turksen K, ed (2016) *Genome editing*. Springer, Suiza. 178 pp.
- Winsor E (1988) Mendelian genetics. *Can Fam Physician* 34: 859-862.
- Zhu X, Xu Y, Yo S, Lu L, Ding M, Cheng J, Song G, Gao X, Yao L, Fan D, Meng S, Zhang X, Hu S, Tian Y (2014) An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 4: 6420.

